(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 659 764**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2012 PCT/EP2012/066215**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13026833**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2012 E 12750364 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2748201**

(54) Título: **Moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T**

(30) Prioridad:

23.08.2011 EP 11178370
16.05.2012 EP 12168192

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2018

(73) Titular/es:

ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren, CH

(72) Inventor/es:

AST, OLIVER;
BRUENKER, PETER;
FAUTI, TANJA;
FREIMOSER-GRUNDSCHOBER, ANNE;
NEUMANN, CHRISTIANE;
KLEIN, CHRISTIAN;
MOESSNER, EKKEHARD y
UMANA, PABLO

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a moléculas biespecíficas de unión a antígeno para la activación de linfocitos T. Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican dichas moléculas biespecíficas de unión a antígeno, a procedimientos para producir las moléculas biespecíficas de unión a antígeno de la invención, y a dichas moléculas biespecíficas de unión a antígeno para su uso en el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

La destrucción selectiva de una célula individual o de un tipo de célula específico es a menudo deseable en una variedad de entornos clínicos. Por ejemplo, el objetivo principal del tratamiento contra el cáncer es destruir específicamente las células tumorales, dejando las células y tejidos sanos intactos y sin daños.

Una forma atractiva de lograr esto es inducir una respuesta inmunitaria contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunitarias tales como los linfocitos citolíticos naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL) ataquen y destruyan las células tumorales. Los CTL constituyen las células efectoras más potentes del sistema inmunitario; sin embargo, no se pueden activar por el mecanismo efector mediado por el dominio Fc de los anticuerpos terapéuticos convencionales.

A este respecto, los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un «brazo» a un antígeno de superficie en las células diana, y con el segundo «brazo» a un componente activador invariable del complejo receptor de linfocitos T (TCR), han adquirido interés en los últimos años. La unión simultánea de dicho anticuerpo a ambas de sus dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y el linfocito T, provocando la activación de cualquier linfocito T citotóxico y la posterior lisis de la célula diana. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria se redirige a las células diana y es independiente de la presentación de antígenos peptídicos por parte de la célula diana o de la especificidad del linfocito T, ya que sería relevante para la activación de CTL restringida por MHC normal. En este contexto, es crucial que los CTL solo se activen cuando una célula diana les presenta el anticuerpo biespecífico, es decir, cuando se imite la sinapsis inmunológica. Son particularmente deseables los anticuerpos biespecíficos que no requieren precondicionamiento o coestimulación de linfocitos para provocar una lisis eficaz de las células diana.

Se han desarrollado varios formatos de anticuerpos biespecíficos y se ha investigado su idoneidad para la inmunoterapia mediada por linfocitos T. Entre ellas, las moléculas llamadas BiTE (atrapadoras de linfocitos T biespecíficas) se han caracterizado muy bien y ya se han mostrado prometedoras en el entorno clínico (revisado en Nagorsen y Bäuerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)). Las BiTE son moléculas scFv en tándem en las que dos moléculas scFv están fusionadas por un conector flexible. Otros formatos biespecíficos en los que se está evaluando la implicación de linfocitos T incluyen diacuerpos (Holliger et al., Prot Eng 9, 299-305 (1996)) y derivados de los mismos, tales como diacuerpos en tándem (Kipriyanov et al., J Mol Biol 293, 41-66 (1999)). Un desarrollo más reciente son las llamadas moléculas DART (redireccionamiento de doble afinidad), que se basan en el formato de diacuerpo pero presentan un puente disulfuro C-terminal para una estabilización adicional (Moore et al., Blood 117, 4542-51 (2011)). Los llamados triomabs, que son moléculas de IgG de ratón/rata híbridas completas y que también se están evaluando actualmente en ensayos clínicos, representan un formato de mayor tamaño (revisado en Seimetz et al., Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)).

La variedad de formatos que se están desarrollando muestra el gran potencial atribuido a la reorientación y activación de los linfocitos T en inmunoterapia. Sin embargo, la tarea de generar anticuerpos biespecíficos adecuados para ello no resulta nada trivial, ya que implica una serie de desafíos que se deben cumplir en relación con la eficacia, la toxicidad, la aplicabilidad y la capacidad de producción de los anticuerpos.

Estructuras pequeñas tales como, por ejemplo, las moléculas BiTE, que son capaces a la vez de entrelazarse eficazmente a células efectoras y diana, tienen una semivida en suero muy corta que requiere que se administren a los pacientes mediante infusión continua. Por otro lado, formatos similares a IgG, que tienen el gran beneficio de tener una larga semivida, sufren toxicidad asociada con las funciones efectoras naturales inherentes a las moléculas de IgG. Su potencial inmunogénico constituye otra característica desfavorable de los anticuerpos biespecíficos similares a IgG, especialmente en los formatos no humanos, para un desarrollo terapéutico exitoso. Finalmente, un desafío importante en el desarrollo general de anticuerpos biespecíficos ha sido la producción de construcciones de anticuerpos biespecíficos en una cantidad y con una pureza clínicamente suficientes, debido al emparejamiento erróneo de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de diferentes especificidades en la coexpresión, lo que disminuye el rendimiento de la construcción correctamente ensamblada y da como resultado una serie de productos secundarios no funcionales que pueden resultar difíciles de separar del anticuerpo biespecífico deseado.

Dadas las dificultades y desventajas asociadas a los anticuerpos biespecíficos actualmente disponibles para inmunoterapia mediada por linfocitos T, sigue existiendo la necesidad de formatos novedosos y mejorados de dichas

moléculas. La presente invención proporciona moléculas biespecíficas de unión a antígeno diseñadas para la activación y reorientación de linfocitos T que combinan una buena eficacia y capacidad de producción con una baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas favorables.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, siendo uno de ellos una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T y siendo el otro de ellos una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de la célula diana, y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de crear una asociación estable; en el que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada en la que las regiones variables o constantes de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están intercambiadas; en el que el primer y el segundo resto de unión a antígeno están fusionados entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico; y en el que la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T (es decir, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T proporciona una unión monovalente al antígeno activador de linfocitos T).

De acuerdo con la invención, el primer y el segundo resto de unión a antígeno de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T están fusionados entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico. En un modo de realización, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno. En otro modo de realización, el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno. En otro modo de realización más, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena ligera Fab al extremo N de la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno. En modos de realización en los que (i) el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno o (ii) el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno, adicionalmente la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden estar fusionadas entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico.

En un modo de realización, en el que (i) el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno o (ii) el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena ligera Fab al extremo N de la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno, el segundo resto de unión a antígeno de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización, en el que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno, el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

En ciertos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana. En uno de dichos modos de realización, el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización particular, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno activadora de linfocitos T están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno. En otro modo de realización particular, el primer y el tercer resto de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno activadora de linfocitos T están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno. Los componentes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T pueden estar fusionados directamente o a través de conectores peptídicos adecuados. En un modo de realización, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno activadora de linfocitos T están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase IgG.

En un modo de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG. En un modo de realización específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1. En otro modo de realización específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_4. En modos de realización particulares, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la

primera y la segunda subunidad del dominio Fc. En uno de dichos modos de realización específicos, un residuo de aminoácido del dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor, generando así una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que se puede colocar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y un residuo de aminoácido en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando así una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que se puede colocar la protuberancia del dominio CH3 de la primera subunidad.

En un modo de realización particular, el dominio Fc exhibe una afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 natural. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora. En un modo de realización, la una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio Fc que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora están en una o más posiciones seleccionadas entre el grupo de L234, L235 y P329 (numeración UE). En modos de realización particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora en las que dichas sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y P329G.

En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En un modo de realización, la función efectora es citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

En un modo de realización particular, el antígeno activador de linfocitos T es CD3. En un modo de realización, el antígeno de la célula diana se selecciona entre el grupo que consiste en: proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antígeno carcinoembrionario (CEA), proteína de activación de fibroblastos (FAP), CD19, CD20 y CD33.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la invención.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la invención, que comprende las etapas de a) cultivo de una célula hospedadora que comprende el polinucleótido aislado de la invención, o un vector que comprende el polinucleótido aislado de la invención; en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T y b) recuperación de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También están abarcados por la invención los procedimientos para usar la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T y la composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de la invención para su uso como un medicamento. En un aspecto se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En un modo de realización específico, la enfermedad es cáncer.

La invención también proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de la invención para su uso en un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana en un individuo, que comprende poner en contacto una célula diana con una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la invención en presencia de un linfocito T, en la que la célula diana es una célula tumoral.

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. Configuraciones a modo de ejemplo de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento. Ilustración de (A) la molécula «1+1 IgG scFab, con un brazo», y (B) la molécula «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido». En la molécula «1+1 IgG scFab, con un brazo», la cadena ligera del Fab dirigido al linfocito T está fusionada a la cadena pesada mediante un conector, mientras que la molécula «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» tiene el conector en el Fab dirigido al tumor. (C) Ilustración de la molécula «2+1 IgG scFab». (D) Ilustración de la molécula «1+1 IgG scFab». (E) Ilustración de la molécula «1+1 IgG Crossfab». (F) Ilustración de la molécula «2+1 IgG Crossfab». (G) Ilustración de la molécula «2+1 IgG Crossfab» con orden alternativo de los componentes Crossfab y Fab («invertidos»). (H) Ilustración de la molécula de «1+1 IgG Crossfab, fusión de cadena ligera (LC)». (F) Ilustración de la molécula «1+1 CrossMab». (J) Ilustración de la molécula «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada». (K) Ilustración de la molécula «1+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada». (L) Ilustración de la molécula «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada, invertida». (M) Ilustración de la molécula «1+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada, invertida». Punto negro: modificación opcional en el dominio Fc que promueve la heterodimerización.

FIGURA 2. SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «1+1 IgG scFab, con un

brazo» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 1, 3, 5), no reducido (A) y reducido (B), y de «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 7, 9, 11), no reducido (C) y reducido (D).

FIGURA 3. Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v), 50 µg de muestra inyectada) de «1+1 IgG scFab, con un brazo» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 1, 3, 5) (A) y «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 7, 9, 11) (B).

FIGURA 4. SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «1+1 IgG scFab, con un brazo» (anti-EGFR/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 43, 45, 57), no reducido (A) y reducido (B), y de «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (anti-EGFR/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 11, 49, 51), no reducido (C) y reducido (D).

FIGURA 5. Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v), 50 µg de muestra inyectada) de «1+1 IgG scFab, con un brazo» (anti-EGFR/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 43, 45, 47) (A) y «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (anti-EGFR/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 11, 49, 51) (B).

FIGURA 6. (A, B) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (anti-FAP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 11, 51, 55), no reducido (A) y reducido (B). (C) Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (anti-FAP/anti-huCD3).

FIGURA 7. SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de (A) «2+1 IgG scFab, P329G LALA» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 21, 23), no reducido (columna 2) y reducido (columna 3); de (B) «2+1 IgG scFab, LALA» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19), no reducido (columna 2) y reducido (columna 3); de (C) «2+1 IgG scFab, wt» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 13, 15), no reducido (columna 2) y reducido (columna 3); y de (D) «2+1 IgG scFab, P329G LALA N297D» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 25, 27), no reducido (columna 2) y reducido (columna 3).

FIGURA 8. Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de (A) «2+1 IgG scFab, P329G LALA» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 21, 23); de (B) «2+1 IgG scFab, LALA» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19); de (C) «2+1 IgG scFab, wt» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 13, 15); y de (D) «2+1 IgG scFab, P329G LALA N297D» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 25, 27).

FIGURA 9. (A, B) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG scFab, P329G LALA» (anti-EGFR/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 45, 47, 53), no reducido (A) y reducido (B). (C) Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de «2+1 IgG scFab, P329G LALA» (anti-EGFR/anti-huCD3).

FIGURA 10. (A, B) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG scFab, P329G LALA» (anti-FAP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 57, 59, 61), no reducido (A) y reducido (B). (C) Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de «2+1 IgG scFab, P329G LALA» (anti-FAP/anti-huCD3).

FIGURA 11. (A, B) SDS PAGE (Tris-Acetato al 4-12 % (A) o Bis/Tris al 4-12 % (B), NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «1+1 IgG Crossfab, Fc (ojal) P329G LALA/Fc (botón) wt» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 29, 31, 33), no reducido (A) y reducido (B). (C) Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de «1+1 IgG Crossfab, Fc (ojal) P329G LALA/Fc (botón) wt» (anti-MCSP/anti-huCD3).

FIGURA 12. (A, B) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG Crossfab» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33), no reducido (A) y reducido (B). (C) Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de «2+1 IgG Crossfab» (anti-MCSP/anti-huCD3).

FIGURA 13. (A, B) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG Crossfab» (anti-MCSP/anti-cyCD3) (véase SEQ ID NO: 3, 5, 35, 37), no reducido (A) y reducido (B). (C) Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de «2+1 IgG Crossfab» (anti-MCSP/anti-cyCD3).

FIGURA 14. (A, B) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG Crossfab, invertido» (anti-CEA/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 33, 63, 65, 67), no reducido (A) y reducido (B). (C) Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; MOPS 2 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM, NaCl

al 0,02 % (p/v); inyección de 50 µg de muestra) de «2+1 IgG Crossfab, invertido» (anti-CEA/anti-huCD3).

FIGURA 15. (A) Estabilidad térmica de «$(scFv)_2$-Fc» y «$(dsscFv)_2$-Fc» (anti-MCSP (LC007)/anti-huCD3 (V9)). Dispersión de luz dinámica, medida en una rampa de temperatura de 25-75 °C a 0,05 °C/min. Curva negra: «$(scFv)_2$-Fc»; curva gris: «$(dsscFv)_2$-Fc». (B) Estabilidad térmica de «2+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 5, 21, 23) y «2+1 IgG Crossfab» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33). Dispersión de luz dinámica, medida en una rampa de temperatura de 25-75 °C a 0,05 °C/min. Curva negra: «2+1 IgG scFab»; curva gris: «2+1 IgG Crossfab».

FIGURA 16. Configuración del ensayo Biacore para (A) la determinación de la interacción de diversos Fc mutantes con FcγRIIIa humano, y para (B) la unión simultánea de construcciones biespecíficas de linfocitos T con diana tumoral y CD3γ$(G_4S)_5$CD3ε–AcTev–Fc(botón)–Avi/Fc(ojal) humano.

FIGURA 17. Unión simultánea de construcciones biespecíficas de linfocitos T al dominio D3 de MCSP humano y CD3γ$(G_4S)_5$CD3ε–AcTev–Fc(botón)–Avi/Fc(ojal) humano. (A) «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33), (B) «2+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 5, 21, 23).

FIGURA 18. Unión simultánea de construcciones biespecíficas de linfocitos T a EGFR humano y CD3γ$(G_4S)_5$CD3ε–AcTev–Fc(botón)–Avi/Fc(ojal) humano. (A) «2+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 45, 47, 53), (B) «1+1 IgG scFab, con un brazo» (véase SEQ ID NO: 43, 45, 47), (C) «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (véase SEQ ID NO: 11, 49, 51) y (D) «1+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 47, 53, 213).

FIGURA 19. Unión de la molécula «$(scFv)_2$» (50 nM) a CD3 expresada en células Jurkat (A), o a MCSP en células Colo-38 (B), medida por FACS. Se representa la intensidad media de fluorescencia en comparación con células no tratadas y células teñidas con el anticuerpo secundario solamente.

FIGURA 20. Unión de la construcción «2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) (50 nM) a CD3 expresada en células Jurkat (A), o a MCSP en células Colo-38 (B), medida por FACS. Se representa la intensidad media de fluorescencia en comparación con células tratadas con la IgG anti-CD3 de referencia (como se indica), células no tratadas y células teñidas con el anticuerpo secundario solamente.

FIGURA 21. Unión de las construcciones «1+1 scFab IgG, con un brazo» (véase SEQ ID NO: 1, 3, 5) y «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (véase SEQ ID NO: 7, 9, 11) (50 nM) a CD3 expresado en células Jurkat (A), o a MCSP en células Colo-38 (B), medida por FACS. Se representa la intensidad media de fluorescencia en comparación con células tratadas con la IgG anti-CD3 o anti-MCSP de referencia (como se indica), células no tratadas y células teñidas con el anticuerpo secundario solamente.

FIGURA 22. Unión dependiente de la dosis de la construcción biespecífica «2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la correspondiente IgG anti-MCSP a MCSP en células Colo-38, medida por FACS.

FIGURA 23. Nivel de expresión en superficie de diferentes marcadores de activación en linfocitos T humanos después de la incubación con construcciones biespecíficas para CD3-MCSP «2+1 scFab LALA» 1 nM (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) o «$(scFv)_2$» en presencia o ausencia de células diana tumorales Colo-38, como se indica (proporción E:T de PBMC a células tumorales = 10:1). Se representa el nivel de expresión del marcador de activación temprana CD69 (A), o el marcador de activación tardía CD25 (B) en linfocitos T $CD8^+$ después de 15 o 24 horas de incubación, respectivamente.

FIGURA 24. Nivel de expresión superficial del marcador de activación tardía CD25 en linfocitos T humanos después de la incubación con construcciones biespecíficas para CD3-MCSP «2+1 scFab LALA» 1 nM (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) o «$(scFv)_2$» en presencia o ausencia de células diana tumorales Colo-38, como se indica (proporción E:T = 5:1). Se representa el nivel de expresión del marcador de activación tardía CD25 en linfocitos T $CD8^+$ (A) o en linfocitos T $CD4^+$ (B) después de 5 días de incubación.

FIGURA 25. Nivel de expresión superficial del marcador de activación tardía CD25 en linfocitos T $CD8^+$ de macaco de dos animales diferentes (macaco Nestor, macaco Nobu) después de 43 horas de incubación con las concentraciones indicadas de la construcción biespecífica «2+1 IgG Crossfab» (dirigida a CD3 de macaco y MCSP humano, véase SEQ ID NO: 3, 5, 35, 37), en presencia o ausencia de células diana tumorales humanas MV-3 que expresan MCSP (proporción E:T = 3:1). Como controles se usaron las IgG de referencia (IgG anti-CD3 de macaco, IgG anti-MCSP humano) o el estímulo no fisiológico PHA-M.

FIGURA 26. Niveles de IFN-γ secretados por linfocitos pan T humanos que se activaron durante 18,5 horas por la construcción biespecífica para CD3-MCSP «2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) en presencia de células tumorales U87MG (proporción E:T = 5:1). Como controles se administraron las IgG anti-CD3 y anti-MCSP correspondientes.

FIGURA 27. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MDA-MB-435 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1) y activación durante 20 horas por diferentes concentraciones de

moléculas biespecíficas «2+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 5, 21, 23), «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «$(scFv)_2$» y las IgG correspondientes.

FIGURA 28. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MDA-MB-435 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1) y activación durante 20 horas por diferentes concentraciones de las construcciones biespecíficas y las IgG correspondientes. Se compararon las construcciones «2+1 IgG scFab» que difieren en su dominio Fc (que tienen un dominio Fc de tipo natural (véase SEQ ID NO: 5, 13, 15) o un dominio Fc mutado para suprimir la función celular efectora (NK): P329G LALA (véase SEQ ID NO: 5, 21, 23), P329G LALA N297D (véase SEQ ID NO: 5, 25, 27)) y la construcción «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33).

FIGURA 29. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales Colo-38 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1), tratadas con la construcción biespecífica para CD3-MCSP «2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19), la molécula «$(scFv)_2$» o las IgG correspondientes durante 18,5 horas.

FIGURA 30. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales Colo-38 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1), tratadas con la construcción biespecífica para CD3-MCSP «2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19), la molécula «$(scFv)_2$» o las IgG correspondientes durante 18 horas.

FIGURA 31. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MDA-MB-435 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1) y activación durante 23,5 horas por diferentes concentraciones de la construcción biespecífica para CD3-MCSP «2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19), la molécula «$(scFv)_2$» o las IgG correspondientes.

FIGURA 32. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales Colo-38 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1) y activación durante 19 horas por diferentes concentraciones de las construcciones biespecíficas para CD3-MCSP «1+1 IgG scFab, con un brazo» (véase SEQ ID NO: 1, 3, 5), «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (véase SEQ ID NO: 7, 9, 11) o «$(scFv)_2$» o las IgG correspondientes.

FIGURA 33. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales Colo-38 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1), tratadas con la construcción biespecífica para CD3-MCSP «1+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 5, 21, 213) o la molécula «$(scFv)_2$» durante 20 horas.

FIGURA 34. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MDA-MB-435 tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1) y activación durante 21 horas por diferentes concentraciones de las construcciones biespecíficas y las IgG correspondientes. Se compararon las construcciones biespecíficas para CD3-MCSP «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «1+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 29, 31, 33), la molécula «$(scFv)_2$» y las IgG correspondientes.

FIGURA 35. Muerte celular (medida por liberación de LDH) de diferentes células diana (células diana tumorales Colo-38 positivas para MCSP, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea o tejido adiposo, o pericitos de la placenta, como se indica) inducida por la activación de linfocitos T humanos por concentraciones de 135 ng/ml o 1,35 ng/ml de la construcción biespecífica para de CD3-MCSP «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) (proporción E:T = 25:1).

FIGURA 36. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células diana tumorales Colo-38, medida después de una incubación durante la noche de 21 h, tras el cocultivo con PBMC humanas y diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP «2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) y «$(scFv)_2$» o una IgG anti-MCSP modificada por glucoingeniería (GlycoMab). La proporción entre células efectoras y células diana (E/T) se fijó en 25:1 (A), o varió como se representa (B). Las PBMC se aislaron a partir de sangre fresca (A) o de una capa leucocítica (B).

FIGURA 37. Efecto citotóxico dependiente del tiempo de la construcción «2+1 IgG Crossfab», dirigido a CD3 de macaco y a MCSP humano (véase SEQ ID NO: 3, 5, 35, 37). Se representa la liberación de LDH a partir de células MV-3 humanas que expresan MCSP tras el cocultivo con PBMC de macaco primarias (proporción E:T = 3:1) durante 24 h o 43 h. Como controles se usaron las IgG de referencia (IgG anti-CD3 de macaco e IgG anti-MCSP humano) a la misma molaridad. PHA-M sirvió como control para la activación de linfocitos T (no fisiológica).

FIGURA 38. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células de melanoma MV-3 positivas para huMCSP tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas CD3-MCSP («2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «$(scFv)_2$») durante ~26 horas.

FIGURA 39. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales LS-174T positivas para EGFR tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-EGFR («2+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 45, 47, 53), «1+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 47, 53, 213) y «$(scFv)_2$») o las IgG de referencia durante 18 horas.

FIGURA 40. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales LS-174T positivas para EGFR tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-EGFR («1+1 IgG scFab, con un brazo» (véase SEQ ID NO: 43, 45, 47), «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (véase SEQ ID NO: 11, 49, 51), «1+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 47, 53, 213) y «$(scFv)_2$») o las IgG de referencia durante 21 horas.

FIGURA 41. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales LS-174T positivas para EGFR tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (A) o linfocitos T humanos indiferenciados (B), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-EGFR («1+1 IgG scFab, con un brazo» (véase SEQ ID NO: 43, 45, 47), «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (véase SEQ ID NO: 11, 49, 51) y «$(scFv)_2$») o las IgG de referencia durante 16 horas. La proporción entre células efectoras y células diana fue de 5:1.

FIGURA 42. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de fibroblastos GM05389 positivos para FAP tras el cocultivo con linfocitos pan T humanos (proporción E:T = 5:1), tratados con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-FAP («1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (véase SEQ ID NO: 11, 51, 55), «1+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 57, 61, 213), «2+1 IgG scFab» (véase SEQ ID NO: 57, 59, 61) y«$(scFv)_2$») durante ~18 horas.

FIGURA 43. Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de CD107a/b, así como de los niveles de perforina en linfocitos T $CD8^+$ que se han tratado con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP («2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) y «$(scFv)_2$») o las IgG de control correspondientes en presencia (A) o ausencia (B) de células diana durante 6 h. Se incubaron linfocitos pan T humanos con 9,43 nM de las diferentes moléculas en presencia o ausencia de células diana tumorales Colo-38 con una proporción entre células efectoras y diana de 5:1. Se añadió monensina después de la primera hora de incubación para aumentar los niveles de proteína intracelular al evitar el transporte de proteínas. Las puertas se establecieron en todas las células positivas para CD107a/b, positivas para perforina o doble positivas, como se muestra.

FIGURA 44. Proliferación relativa de linfocitos T humanos $CD8^+$ (A) o $CD4^+$ (B) tras la incubación con 1 nM de diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP («2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) o «$(scFv)_2$») o las IgG de control correspondientes en presencia o ausencia de células diana tumorales Colo-38 en una proporción entre células efectoras y tumorales de 5:1. Los linfocitos pan T humanos marcados con CFSE se caracterizaron por FACS. El nivel de proliferación relativa se determinó estableciendo una puerta alrededor de las células no proliferantes y usando el número de célula de esta puerta en relación con el número total de células medidas como la referencia.

FIGURA 45. Niveles de diferentes citocinas medidos en el sobrenadante de PBMC humanas después del tratamiento con 1 nM de construcciones biespecíficas para CD3-MCSP («2+1 IgG scFab, LALA» (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19) o «$(scFv)_2$») o las IgG de control correspondientes en presencia (A) o ausencia (B) de células tumorales Colo-38 durante 24 horas. La proporción entre células efectoras y células diana fue de 10:1.

FIGURA 46. Niveles de diferentes citocinas medidos en el sobrenadante de sangre completa después del tratamiento con 1 nM de diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP («2+1 IgG scFab», «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) o «$(scFv)_2$») o las IgG de control correspondientes en presencia (A, B) o ausencia (C, D) de células tumorales Colo-38 durante 24 horas. Entre las construcciones biespecíficas se encontraban diferentes construcciones «2+1 IgG scFab» que tenían un dominio Fc de tipo natural (véase SEQ ID NO: 5, 13, 15), o un dominio Fc mutado para suprimir la función celular efectora (NK) (LALA (véase SEQ ID NO: 5, 17, 19), P329G LALA (véase SEQ ID NO: 5, 2, 23) y P329G LALA N297D (véase SEQ ID NO: 5, 25, 27)).

FIGURA 47. Análisis CE-SDS. Electroferograma mostrado como SDS PAGE de «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179) (columna 1: reducido, columna 2: no reducido).

FIGURA 48. Cromatografía analítica de exclusión por tamaño de «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179) (producto final). Se inyectaron 20 µg de muestra.

FIGURA 49. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MV-3 positivas para MCSP tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP durante ~44 horas («2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y 2+1 «IgG Crossfab, LC conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179)). Se aislaron PBMC humanas a partir de sangre fresca de voluntarios sanos.

FIGURA 50. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales Colo-38 positivas para MCSP tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP durante ~22 horas («2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y 2+1 «IgG Crossfab, LC conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179)). Se aislaron PBMC humanas a partir de sangre fresca de voluntarios sanos.

FIGURA 51. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales Colo-38 positivas para MCSP tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas para

CD3-MCSP durante ~22 horas («2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y 2+1 «IgG Crossfab, LC conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179)). Se aislaron PBMC humanas a partir de sangre fresca de voluntarios sanos.

FIGURA 52. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales WM266-4 positivas para MCSP tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1), tratadas con diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP durante ~22 horas («2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y 2+1 «IgG Crossfab, LC conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179)). Se aislaron PBMC humanas a partir de sangre fresca de voluntarios sanos.

FIGURA 53. Nivel de expresión superficial del marcador de activación temprana CD69 (A) y el marcador de activación tardía CD25 (B) en linfocitos T $CD8^+$ humanos después de 22 horas de incubación con 10 nM, 80 pM o 3 pM de diferentes construcciones biespecíficas para CD3-MCSP («2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «2+1 IgG Crossfab, LC conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179)) en presencia o ausencia de células diana tumorales Colo-38 que expresan MCSP humano (proporción E:T = 10:1).

FIGURA 54. Análisis CE-SDS. (A) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «1+1 IgG Crossfab»; intercambio VL/VH (LC007/V9) (véase SEQ ID NO: 5, 29, 33, 181): a) no reducido, b) reducido. (B) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «1+1 IgG CrossMab»; intercambio CL/CH1 (LC007/V9) (véase SEQ ID NO: 5, 23,183, 185): a) reducido, b) no reducido. (C) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «2+1 IgG Crossfab, invertido»; intercambio CL/CH1 (LC007/V9) (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 187): a) reducido, b) no reducido. (D) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «2+1 IgG Crossfab»; intercambio VL/VH (M4-3 ML2/V9) (véase SEQ ID NO: 33, 189, 191, 193): a) reducido, b) no reducido. (E) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «2+1 IgG Crossfab»; intercambio CL/CH1 (M4-3 ML2/V9) (véase SEQ ID NO: 183, 189, 193, 195): a) reducido, b) no reducido. (F) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «2+1 IgG Crossfab, invertido»; intercambio CL/CH1 (CH1A1A/V9) (véase SEQ ID NO: 65, 67, 183, 197): a) reducido, b) no reducido. (G) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «2+1 IgG Crossfab»; intercambio CL/CH1 (M4-3 ML2/H2C) (véase SEQ ID NO: 189, 193, 199, 201): a) reducido, b) no reducido. (H) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «2+1 IgG Crossfab, invertido»; intercambio CL/CH1 (431/26/V9) (véase SEQ ID NO: 183, 203, 205, 207): a) reducido, b) no reducido. (I) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de ««2+1 IgG Crossfab, fusión de cadena ligera» (CH1A1A/V9) (véase SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213): a) reducido, b) no reducido. (J) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG Crossfab» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217), no reducido (izquierda) y reducido (derecha). (K) Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de «2+1 IgG Crossfab, invertido» (anti-MCSP/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219): a) reducido, b) no reducido. (L) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «1+1 IgG Crossfab» (anti-CD33/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 33, 213, 221, 223), reducido (izquierda) y no reducido (derecha). (M) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG Crossfab» (anti-CD33/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 33, 221, 223, 225), reducido (izquierda) y no reducido (derecha). (N) SDS PAGE (Bis/Tris al 4-12 %, NuPage Invitrogen, teñido con Coomassie) de «2+1 IgG Crossfab» (anti-CD20/anti-huCD3) (véase SEQ ID NO: 33, 227, 229, 231), no reducido.

FIGURA 55. Unión de construcciones biespecíficas (CEA/CD3) «2+1 IgG Crossfab, invertido (VL/VH)» (véase SEQ ID NO: 33, 63, 65, 67) y «2+1 IgG Crossfab, invertido (CL/CH1)» (véase SEQ ID NO: 65, 67, 183, 197)) a CD3 humano, expresada por células Jurkat (A), o a CEA humano, expresada por células LS-174T (B), según lo determinado por FACS. Como control también se evaluaron la concentración máxima equivalente de las IgG de referencia y la tinción de fondo debida al anticuerpo secundario marcado (fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure de cabra conjugado con anti-FITC humano, específico para fragmento Fcγ, Jackson Immuno Research Lab n.º 109-096-098).

FIGURA 56. Unión de construcciones biespecíficas (MCSP/CD3) «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «2+1 IgG Crossfab, invertido» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 187)) a CD3 humano, expresada por células Jurkat (A), o a MCSP humano, expresada por células tumorales WM266-4 (B), según lo determinado por FACS.

FIGURA 57. Unión de la construcción biespecífica «1+1 IgG Crossfab, fusión de cadena ligera» (véase SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213) a CD3 humano, expresada por células Jurkat (A), o a CEA humano, expresada por células LS-174T (B), según lo determinado por FACS.

FIGURA 58. Unión de las construcciones biespecíficas «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217) y «2+1 IgG Crossfab, invertido» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219) a CD3 humano, expresada por células Jurkat (A), o a MCSP humano, expresada por células tumorales WM266-4 (B), según lo determinado por FACS.

FIGURA 59. Nivel de expresión superficial del marcador de activación temprana CD69 (A) o el marcador de activación tardía CD25 (B) en linfocitos T $CD4^+$ o $CD8^+$ humanos después de 24 horas de incubación con las concentraciones indicadas de las construcciones biespecíficas para CD3/MCSP «1+1 CrossMab» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 185), «1+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 29, 33, 181) y «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33). El ensayo se realizó en presencia o ausencia de células diana MV-3, según se indica.

FIGURA 60. Nivel de expresión superficial del marcador de activación temprana CD25 en células $CD4^+$ o $CD8^+$ de dos

macacos diferentes (A y B) en presencia o ausencia de células tumorales MV-3 positivas para huMCSP tras el cocultivo con PBMC de macaco (proporción E:T = 3:1, normalizado a números $CD3^+$), tratadas con la construcción «2+1 IgG Cossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217) y la construcción «2+1 IgG Cossfab, invertida» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219) durante ~41 horas.

FIGURA 61. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MKN-45 (A) o LS-174T (B) tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1) y activación durante 28 horas por diferentes concentraciones de la construcción «2+1 IgG Crossfab, invertido (VL/VH)» (véase SEQ ID NO: 33, 63, 65, 67) frente a la construcción «2+1 IgG Crossfab, invertido (CL/CH1)» (véase SEQ ID NO: 65, 67, 183, 197).

FIGURA 62. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales WM266-4 tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1) y la activación durante 26 horas por diferentes concentraciones de la construcción «2+1 IgG Crossfab (VL/VH)» (véase SEQ ID NO: 33, 189, 191, 193) frente a la construcción «2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)» (véase SEQ ID NO: 183, 189, 193, 195).

FIGURA 63. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MV-3 tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1) y la activación durante 27 horas por diferentes concentraciones de la construcción «2+1 IgG Crossfab (VH/VL)» (véase SEQ ID NO: 33, 189, 191, 193) frente a la construcción «2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)» (véase SEQ ID NO: 183, 189, 193, 195).

FIGURA 64. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales humanas WM266-4 (A) o MV-3 (B) (B) positivas para MCSP tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1) y activación durante 21 horas por diferentes concentraciones de las construcciones «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33), «1+1 CrossMab» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 185) y «1+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 29, 33, 181), según se indica.

FIGURA 65. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MKN-45 (A) o LS-174T (B) tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1) y activación durante 28 horas por diferentes concentraciones de la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión LC» (véase SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213).

FIGURA 66. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MC38-huCEA tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1) y activación durante 24 horas por diferentes concentraciones de la de la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión LC» (véase SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213) frente a una referencia no diana de «2+1 IgG Crossfab».

FIGURA 67. Muerte celular (medida por la liberación de LDH) de células tumorales MV-3 (A) o WM266-4 (B) positivas para MCSP tras el cocultivo con PBMC humanas (proporción E:T = 10:1), tratadas con las construcciones «2+1 IgG Crossfab (V9)» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33), «2+1 IgG Crossfab, invertido (V9)» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 187), «2+1 IgG Crossfab (anti-CD3)» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217) y «2+1 IgG Crossfab, invertido (anti-CD3)» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219).

Descripción detallada

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se defina lo contrario a continuación.

Como se usa en el presente documento, el término «molécula de unión a antígeno» se refiere, en su sentido más amplio, a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos de los mismos.

El término «biespecífico» significa que la molécula de unión a antígeno se puede unir de forma específica a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula biespecífica de unión a antígeno comprende dos sitios de unión a antígeno, siendo cada uno de ellos específico para un determinante antigénico diferente. En ciertos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno es capaz de unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, particularmente dos determinantes antigénicos expresadosen dos células distintas.

El término «valente», como se usa en el presente documento, denota la presencia de un número especificado de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. Como tal, el término «unión monovalente a un antígeno» indica la presencia de un (y no más de un) sitio de unión a antígeno específico para el antígeno en la molécula de unión a antígeno.

Un «sitio de unión a antígeno» se refiere al sitio, es decir, uno o más residuos de aminoácido, de una molécula de unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo contiene residuos de aminoácido de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Una

molécula de inmunoglobulina natural tiene típicamente dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab tiene típicamente un único sitio de unión a antígeno.

Como se usa en el presente documento, el término «resto de unión a antígeno» se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a un determinante antigénico. En un modo de realización, un resto de unión a antígeno es capaz de dirigir la entidad a la que está unido (por ejemplo, un segundo resto de unión a antígeno) hasta un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que lleva el determinante antigénico. En otro modo de realización, un resto de unión a antígeno es capaz de activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno complejo receptor de linfocitos T. Los restos de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, tal como se define adicionalmente en el presente documento. Los restos de unión a antígeno particulares incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena ligera de anticuerpo. En ciertos modos de realización, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo, como se define adicionalmente en el presente documento y es conocido en la técnica. Las regiones constantes de cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α, δ, ε, γ o μ. Las regiones constantes de cadena ligera útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ.

Como se usa en el presente documento, el término «determinante antigénico» es sinónimo de «antígeno» y «epítopo» y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional compuesta por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica al que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo antígeno-resto de unión a antígeno. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de las células tumorales, en las superficies de las células infectadas por virus, en las superficies de otras células enfermas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas a las que se hace referencia en el presente documento como antígenos (por ejemplo, MCSP, FAP, CEA, EGFR, CD33, CD3) pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente vertebrada, incluidos mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando en el presente documento se hace referencia a una proteína específica, el término abarca la proteína no procesada de «longitud completa», así como cualquier forma de proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Las proteínas humanas ejemplares útiles como antígenos incluyen, pero no se limitan a: proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), también conocido como proteoglucano de sulfato de condroitina 4 (UniProt n.º Q6UVK1 (versión 70), n.º RefSeq NCBI NP_001888.2); proteína de activación de fibroblastos (FAP), también conocida como seprasa (Uni Prot n.º Q12884, Q86Z29, Q99998, n.º de acceso NCBI NP_004451); antígeno carcinoembrionario (CEA), también conocido como molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario (UniProt n.º P06731 (versión 119), n.º RefSeq NCBI NP_004354.2); CD33, también conocido como gp67 o Siglec-3 (UniProt n.° P20138, n.º de acceso NCBI NP_001076087, NP_001171079); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), también conocido como ErbB-1 o Her1 (UniProt n.° P0053, n.º de acceso NCBI NP_958439, NP_958440) y CD3, particularmente la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), n.º RefSeq NCBI NP_000724.1, SEQ ID NO: 265 para la secuencia humana, o UniProt n.º Q95LI5 (versión 49), n.º GenBank NCBI BAB71849.1, SEQ ID NO: 266 para la secuencia de macaco [*Macaca fascicularis*]. En ciertos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento se une a un epítopo de un antígeno activador de linfocitos T o un antígeno de célula diana que se conserva entre el antígeno activador de linfocitos T o el antígeno diana de diferentes especies.

Por «unión específica» se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un resto de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (en un instrumento BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del resto de unión a antígeno al antígeno medida, por ejemplo, mediante SPR. En ciertos modos de realización, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión a antígeno que comprende ese resto de unión a antígeno, tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

«Afinidad» se refiere a la fortaleza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su socio de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, «afinidad de unión» se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, un resto de uncción a antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su socio Y se puede representar, en general, mediante la constante de disociación (K_D), que es la proporción entre las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{dis} y k_{as}, respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente

documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).

«Unión reducida», por ejemplo, unión reducida a un receptor Fc, se refiere a una disminución de la afinidad por la interacción respectiva, medida por ejemplo por SPR. Para mayor claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión completa de la interacción. Por el contrario, «unión aumentada» se refiere a un aumento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

Un «antígeno activador de linfocitos T», como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico expresado en la superficie de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, que es capaz de inducir la activación de linfocitos T al interaccionar con una molécula de unión a antígeno. De manera específica, la interacción de una molécula de unión a antígeno con un antígeno activador de linfocitos T puede inducir la activación de linfocitos T al activar la cascada de señalización del complejo receptor de linfocitos T. En un modo de realización particular, el antígeno activador de linfocitos T es CD3.

«Activación de linfocitos T», como se usa en el presente documento, se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, seleccionadas entre: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento son capaces de inducir la activación de los linfocitos T. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

Un «antígeno de célula diana», como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral.

Como se usa en el presente documento, los términos «primero» y «segundo» con respecto a restos de unión a antígeno, etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir un orden u orientación específicos de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, a menos que así se indique explícitamente.

Una «molécula Fab» se refiere a una proteína que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada (la «cadena pesada Fab») y el dominio VL y CL de la cadena ligera (la «cadena ligera Fab») de una inmunoglobulina.

Por «fusionado» se entiende que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad del dominio Fc) están unidos por enlaces peptídicos, directamente o mediante uno o más conectores peptídicos.

Como se usa en el presente documento, el término «de cadena única» se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente por enlaces peptídicos. En ciertos modos de realización, uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab de cadena única, es decir, una molécula Fab en la que la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están conectadas por un conector peptídico para formar una única cadena peptídica. En uno de dichos modos de realización particulares, el extremo C de la cadena ligera Fab está conectado al extremo N de la cadena pesada Fab en la molécula Fab de cadena única.

Por una molécula Fab «entrecruzada» (también llamada «Crossfab») se entiende una molécula Fab en la que las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera Fab están intercambiadas, es decir, la molécula Fab entrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera y la región constante de la cadena pesada, y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera. Para mayor claridad, en una molécula Fab entrecruzada en la que las regiones variables de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están intercambiadas, la cadena peptídica que comprende la región constante de la cadena pesada se denomina la «cadena pesada» de la molécula Fab entrecruzada en el presente documento. Por el contrario, en una molécula Fab entrecruzada en la que las regiones constantes de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están intercambiadas, la cadena peptídica que comprende la región variable de la cadena pesada se denomina la «cadena pesada» de la molécula Fab entrecruzada en el presente documento.

El término «molécula de inmunoglobulina» se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que están unidas con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamada región constante de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL), también llamado región constante de la cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de los cinco tipos, llamados α (IgA), (IgD), ε (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), y algunos de ellos se pueden dividir adicionalmente en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG_1), γ_2 (IgG_2), γ_3 (IgG_3), γ_4

(IgG_4), α_1 (IgA_1) y α_2 (IgA_2). La cadena ligera de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, unidos a través de la región bisagra de inmunoglobulina.

El término «anticuerpo» se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un «fragmento de anticuerpo» se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende un segmento de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de un único dominio. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden los residuos del epítopo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* aumentada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de un único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertos modos de realización, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar por diversas técnicas incluyendo, pero no limitadas a la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fagos), como se describe en el presente documento.

El término «dominio de unión a antígeno» se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión a antígeno se puede proporcionar, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). Particularmente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH).

El término «región variable» o «dominio variable» se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural, en general, tienen estructuras similares, en las que cada dominio está compuesto por cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt et al., Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

El término «región hipervariable» o «HVR», como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a su secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente («bucles hipervariables»). Generalmente, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Con la excepción de la CDR1 de la VH, las CDR comprenden, en general, los residuos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan «regiones determinantes de complementariedad» (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera indistinta en referencia a segmentos de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) y por Chothia et al., J Mol Biol 196: 901-917 (1987), donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o a variantes de la misma está destinada a estar incluida dentro del alcance del término, como se define y se usa en el presente documento. Los residuos de aminoácido apropiados que abarcan las CDR, tal como se definen en cada una de las referencias citadas, se exponen a continuación en la Tabla 1 a modo de comparación. El número exacto de residuos que abarca una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y del tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR[1]

CDR	Kabat	Chothia	AbM[2]
CDR1 V_H	31-35	26-32	26-35

CDR2 V_H	50-65	52-58	50-58
CDR3 V_H	95-102	95-102	95-102
CDR1 V_L	24-34	26-32	24-34
CDR2 V_L	50-56	50-52	50-56
CDR3 V_L	89-97	91-96	89-97

[1] La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 está de acuerdo con las convenciones de numeración establecidas por Kabat et al. (véase abajo).

[2] «AbM» con una «b» minúscula, como se utiliza en la Tabla 1, se refiere a las CDR definidas por el programa informático de modelado de anticuerpos «AbM» de Oxford Molecular.

Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de «numeración de Kabat» a cualquier secuencia de región variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, «numeración de Kabat» se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest» (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de las posiciones específicas de los residuos de aminoácido en una región variable de anticuerpo están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Las secuencias polipeptídicas del listado de secuencias (es decir, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, etc.) no están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, está dentro de la experiencia ordinaria del experto en la técnica convertir la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

«Región estructural» o «FR» se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

La «clase» de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

El término «dominio Fc» o «región Fc» se usa en el presente documento para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos un segmento de la región constante. El término incluye las regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para que se extienda desde el residuo Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina carboxiterminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o la región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración UE, también llamado índice UE, como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Una «subunidad» de un dominio Fc, como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de autoasociarse de manera estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y uno CH3 de IgG.

Una «modificación promotora de la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc» es una manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad de dominio Fc. con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación promotora de la asociación, como se usa en el presente documento, incluye particularmente modificaciones separadas hechas en cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en la que las modificaciones son complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades de dominio Fc. Por ejemplo, una modificación promotora de la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas subunidades del dominio Fc a fin de hacer que su asociación sea estéricamente o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por lo tanto, la (hetero)dimerización se produce entre un polipéptido que comprende la primera subunidad de dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad de dominio Fc, que podría no ser idéntica en el sentido de que los componentes adicionales fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son iguales. En algunos modos de realización, la modificación promotora de la asociación comprende una mutación de aminoácido en el dominio Fc, específicamente una sustitución de aminoácido. En un modo de realización particular, la modificación promotora de la asociación comprende una mutación de aminoácido separada, específicamente una

sustitución de aminoácido, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

El término «funciones efectoras» se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, absorción de antígeno mediada por complejos inmunitarios por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Como se usa en el presente documento, se considera que los términos «ingeniería, manipulado por ingeniería, genomanipulación, genomodificación» incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido recombinante o natural o fragmento del mismo. La genomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación, o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estas aproximaciones.

El término «mutación de aminoácido», como se usa en el presente documento, pretende abarcar las sustituciones, eliminaciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos. Se puede realizar cualquier combinación de sustitución, eliminación, inserción y modificación para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, reducida unión a un receptor Fc o aumentada asociación a otro péptido. Las eliminaciones e inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen eliminaciones e inserciones de aminoácidos amino- y/o carboxiterminales. Las mutaciones de aminoácidos particulares son sustituciones de aminoácidos. Con el fin de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, son particularmente preferentes las sustituciones de aminoácidos no conservadoras, es decir, la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene diferentes propiedades estructurales y/o químicas. Las sustituciones de aminoácidos incluyen la sustitución por aminoácidos no naturales o por derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Las mutaciones de aminoácidos se pueden generar usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida, PCR, síntesis de genes y similares. Se contempla que los procedimientos para alterar el grupo de cadena lateral de un aminoácido por procedimientos distintos de la ingeniería genética, tales como la modificación química, también pueden ser útiles. En el presente documento se pueden usar diferentes designaciones para indicar la misma mutación de aminoácido. Por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc por glicina se puede indicar como 329G, G329, G_{329}, P329G o Pro329Gly.

Como se usa en el presente documento, el término «polipéptido» se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término «polipéptido» se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, «proteína», «cadena de aminoácidos» o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos se incluyen dentro de la definición de «polipéptido», y el término «polipéptido» se puede usar en lugar de, o de manera intercambiable con, cualquiera de estos términos. El término «polipéptido» también pretende referirse a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, que incluyen, entre otros, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o producir mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluso por síntesis química. Un polipéptido divulgado en el presente documento puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más, o 2000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, pero que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, y se denominan desplegados.

Por un polipéptido «aislado» o una variante, o un derivado del mismo se entiende un polipéptido que no se encuentra en su medio natural. No se requiere un nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede eliminar de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células hospedadoras se consideran aislados para el propósito de la presente divulgación, ya que son polipéptidos naturales o recombinantes que se han separado, fraccionado o se han purificado parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada.

«Porcentaje (%) de identidad de una secuencia de aminoácidos» con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido de la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible al público, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los

parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 lo creó Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la oficina de propiedad intelectual de EE. UU., Washington DC, 20559, en la que se ha registrado con el n.º de registro de propiedad intelectual de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede recopilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe recopilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias los establece el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B (que, de forma alternativa, se puede expresar como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o que comprende un cierto porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de residuos de aminoácido valorados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de B respecto a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

El término «polinucleótido» se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como el encontrado en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA). El término «molécula de ácido nucleico» se refiere a uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido «aislado» se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente divulgación. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que contienen normalmente la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente de forma extracromosómica o se encuentra en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* divulgados en el presente documento, así como formas de cadena positiva y negativa, y formas de cadena doble. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados divulgados en el presente documento incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma o un terminador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, un 95 % «idéntica» a una secuencia de nucleótidos de referencia divulgada en el presente documento, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica al menos en un 95 % a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos de la secuencia de referencia se puede eliminar o sustituir por otro nucleótido o un número de nucleótidos de hasta un 5 % de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como una cuestión práctica, si cualquier secuencia de polinucleótido particular es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % un o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos, tales como los discutidos anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

El término «casete de expresión» se refiere a un polinucleótido generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar a un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el segmento de casete de expresión

recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que hay que transcribir y un promotor. En ciertos modos de realización, el casete de expresión divulgado en el presente documento comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas biespecíficas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento o fragmentos de las mismas.

El término «vector» o «vector de expresión» es sinónimo de «construcción de expresión» y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que está asociado de forma funcional en una célula diana. El término incluye el vector como una construcción de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. El vector de expresión divulgado en el presente documento comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que está codificada por el gen se produce por la maquinaria de transcripción y/o traducción celular. En un modo de realización, el vector de expresión divulgado en el presente documento comprende un casete de expresión que comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas biespecíficas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento o fragmentos de las mismas.

Los términos «célula hospedadora», «línea celular hospedadora» y «cultivo de células hospedadoras» se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen «transformantes» y «células transformadas», que incluyen la célula primaria transformada y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica a una célula precursora en cuanto al contenido de ácido nucleico, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula originalmente transformada también se incluye en el presente documento. Una célula hospedadora es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar las moléculas biespecíficas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento. Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamíferos, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células de planta, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, una planta transgénica o un tejido vegetal o animal cultivado.

Un «receptor Fc activador» es un receptor Fc que, después del acoplamiento por un dominio Fc de un anticuerpo, provoca eventos de señalización que estimulan a la célula que lleva el receptor para que realice funciones efectoras. Los receptores Fc activadores humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que conduce a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por parte de células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o derivados de los mismos que comprenden una región Fc, en general a través de la parte de proteína que está en el extremo N a la región Fc. Como se usa en el presente documento, el término «ADCC reducida» se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, mediante el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, requerido para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, por el mecanismo de ADCC. La reducción en ADCC se refiere a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células hospedadoras, aplicando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y conservación, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no se ha modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, la reducción en ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácidos que reduce la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esa sustitución de aminoácidos en el dominio Fc. Los ensayos adecuados para medir la ADCC son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2006/082515 o la publicación PCT n.º WO 2012/130831).

Una «cantidad eficaz» de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para producir un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una «cantidad terapéuticamente eficaz» de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene los efectos adversos de una enfermedad.

Un «individuo» o «sujeto» es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). Particularmente, el individuo o sujeto es un ser humano.

El término «composición farmacéutica» se refiere a una preparación que está en tal forma que permite la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma para ser eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un «vehículo farmacéuticamente aceptable» se refiere a un ingrediente de una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, un excipiente, un estabilizante o un conservante.

Como se usa en el presente documento, «tratamiento» (y variaciones gramaticales del mismo tales como «tratar» o «tratando») se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural de una enfermedad en un individuo que está recibiendo tratamiento, y que se puede realizar como profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término «prospecto» se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, tratamiento de combinación, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

Descripción detallada de los modos de realización

En el presente documento se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, siendo uno de ellos una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T y siendo el otro de ellos una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de crear una asociación estable;

en la que el primer resto de unión a antígeno es

(a) una molécula Fab de cadena única en la que la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están conectadas por un conector peptídico, o

(b) una molécula Fab entrecruzada en la que las regiones variables o constantes de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están intercambiadas.

Formatos de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T

Los componentes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Las configuraciones a modo de ejemplo se representan en la Figura 1.

En algunos modos de realización, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

En uno de dichos modos de realización particulares, el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno. En uno de dichos modos de realización específicos, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en el que el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno, y el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización incluso más específico, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de cadena única. Alternativamente, en un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada. Opcionalmente, si el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada, la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En uno de dichos modos de realización alternativos, el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab con el extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc. En uno de dichos modos de realización específicos, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en el que el primer y el segundo resto de unión a antígeno están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc. En un modo de realización incluso más específico, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de cadena única. Alternativamente, en un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada.

En otro más de dichos modos de realización, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena ligera Fab al extremo N de la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno. En uno de dichos modos de realización específicos, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en el que el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo N de la cadena ligera Fab al extremo C de la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno, y el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización incluso más específico, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada.

En otros modos de realización, el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

En uno de dichos modos de realización particulares, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno. En uno de dichos modos de realización específicos, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en el que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización incluso más específico, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada. Opcionalmente, la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En particular en estos modos de realización, el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T. En otros modos de realización, el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

Los restos de unión a antígeno se pueden fusionar al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en el que «n» es, en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4. Un conector peptídico particularmente adecuado para fusionar las cadenas ligeras Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno entre sí es $(G_4S)_2$. Un conector peptídico ejemplar adecuado para conectar las cadenas pesadas Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno es EPKSC(D)-$(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 150 y 151). Adicionalmente, los conectores pueden comprender (un segmento de) una región de bisagra de inmunoglobulina. Particularmente cuando un resto de unión a antígeno está fusionado con el extremo N de una subunidad de dominio Fc, se puede fusionar a través de una región bisagra de inmunoglobulina o un segmento de la misma, con o sin un conector peptídico adicional.

Una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T con un único resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana (por ejemplo, como se muestra en la Figura 1A, 1B, 1D, 1E, 1H, 1I, 1K o 1M) es útil, particularmente en los casos en los que se espera la internalización del antígeno de la célula diana después de la unión de un resto de unión a antígeno de alta afinidad. En dichos casos, la presencia de más de un resto de unión a antígeno específico para el antígeno de la célula diana puede potenciar la internalización del antígeno de la célula diana, reduciendo así su disponibilidad.

En muchos otros casos, sin embargo, será ventajoso tener una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprenda dos o más restos de unión a antígeno específicos para un antígeno de célula diana (véase los ejemplos en las Figuras 1C, 1F, 1G, 1J o 1L), por ejemplo, para optimizar la orientación al sitio diana o para permitir el entrelazamiento de los antígenos de la célula diana.

Por consiguiente, en ciertos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento comprende adicionalmente un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana. En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno es capaz unirse específicamente al mismo antígeno de célula diana que el primer o segundo resto de unión a antígeno. En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización particular, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el

extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno. En uno de dichos modos de realización, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de cadena única. En uno de dichos modos de realización particulares, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada. Opcionalmente, si el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada, la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí. El segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un modo de realización particular, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno están fusionados cada uno al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG_1 humana. En un modo de realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase IgG. En un modo de realización incluso más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG_1. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG_4. En un modo de realización particular adicional, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otros modos de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T consiste esencialmente en una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T en el que el resto de unión a antígeno es una molécula Fab de cadena única o una molécula Fab entrecruzada, particularmente una molécula Fab entrecruzada, fusionada al extremo N de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, opcionalmente a través de un conector peptídico.

En un modo de realización alternativo, el primer y el tercer resto de unión a antígeno están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno. En uno de dichos modos de realización específicos, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos, en el que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en el que el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. En uno de dichos modos de realización particulares, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada. Opcionalmente, la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

En algunas de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento, la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno están fusionadas entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico. Dependiendo de la configuración del primer y el segundo resto de unión a antígeno, la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno se puede fusionar en su extremo C con el extremo N de la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno, o la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno se puede fusionar en su extremo C con el extremo N de la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno. La fusión de las cadenas ligeras Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno reduce además el emparejamiento erróneo de cadenas pesadas y ligeras Fab no comparables, y también reduce el número de plásmidos necesarios para la expresión de algunas de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento.

En ciertos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una primera cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con un conector peptídico, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VL-CL-conector-VH-CH1-CH2-CH2(-CH4)), y un polipéptido en el que una segunda cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). En algunos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende además un segundo polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En ciertos modos de realización, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En algunos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una primera cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con un conector peptídico, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una segunda cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VL-CL-conector-VH-CH1-VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). En uno de estos modos de realización, dicha molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende además un segundo polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de acuerdo con estos modos de realización puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc (CH2-CH3(-CH4)), o (ii) un polipéptido en el que una tercera cadena pesada

Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)) y un tercer polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En ciertos modos de realización, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En ciertos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una primera región variable de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena pesada Fab (es decir, una cadena pesada Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada está reemplazada por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VL-CH1-CH2-CH2(-CH4)), y un polipéptido en el que una segunda cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). En algunos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que una región variable de cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena ligera Fab (VH-CL) y un polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En ciertos modos de realización, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En modos de realización alternativos, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una primera región variable de cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena ligera Fab (es decir, una cadena pesada Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada está reemplazada por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CL-CH2-CH2(-CH4)), y un polipéptido en el que una segunda cadena Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). En algunos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que una región variable de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena pesada Fab (VL-CH1) y un polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En ciertos modos de realización, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En algunos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una primera región variable de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena pesada Fab (es decir, una cadena pesada Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada está reemplazada por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una segunda cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). En otros modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una primera región variable de cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena ligera Fab (es decir, una cadena pesada Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada está reemplazada por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una segunda cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CL-VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). En otros modos de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una segunda cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región variable de cadena ligera Fab. que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena pesada Fab (es decir, una cadena pesada Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena pesada está reemplazada por una región variable de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3(-CH4)). En otros modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una segunda cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región variable de cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena ligera Fab (es decir, una cadena pesada Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena pesada está reemplazada por una región constante de cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3(-CH4)).

En algunos de estos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido de cadena ligera Fab entrecruzada, en el que una región variable de cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena ligera Fab (VH-CL) y un polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En otros de estos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido de cadena ligera Fab entrecruzada, en el que una región variable de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena pesada Fab (VL-CH1) y un polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En aún otros de estos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que una región variable de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con un polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CH1-VL-CL), un polipéptido en el que una región variable de cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con un polipéptido de cadena ligera Fab (VH-CL-VL-CL), un polipéptido en el que un

polipéptido de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región variable de cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena pesada Fab (VL-CL-VL-CH1), o un polipéptido en el que un polipéptido de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región variable de cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena ligera Fab (VL-CL-VH-CL).

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de acuerdo con estos modos de realización puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc (CH2-CH3(-CH4)), o (ii) un polipéptido en el que una tercera cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)) y un tercer polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En ciertos modos de realización, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una segunda cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región variable de cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena pesada Fab (es decir, una cadena ligera Fab entrecruzada, en la que la región constante de cadena ligera está reemplazada por una región constante de cadena pesada) (VL-CL-VL-CH1), un polipéptido en el que una segunda cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)), y un polipéptido en el que una primera región variable de cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena ligera Fab (VH-CL). En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que una segunda cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región variable de cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena ligera Fab (es decir, una cadena ligera Fab entrecruzada, en la que la región variable de cadena ligera está reemplazada por una región variable de cadena pesada) (VL-CL-VH-CL), un polipéptido en el que una segunda cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)), y un polipéptido en el que una primera región variable de cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una primera región constante de cadena pesada Fab (VL-CH1). La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de acuerdo con estos modos de realización puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc (CH2-CH3(-CH4)), o (ii) un polipéptido en el que una tercera cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad de dominio Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)) y un tercer polipéptido de cadena ligera Fab (VL-CL). En ciertos modos de realización, los polipéptidos están unidos covalentemente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro.

De acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización anteriores, los componentes de la molécula biespecífica de unión al antígeno activadora de linfocitos T (por ejemplo, resto de unión a antígeno, dominio Fc) se pueden fusionar directamente o a través de diversos conectores, particularmente conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos, que se describen en el presente documento o son conocidos en la técnica. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en el que «n» es, en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4.

Dominio Fc

El dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, en el que cada subunidad comprende los dominios constantes de cadena pesada CH2 y CH3 de IgG. Las dos subunidades del dominio Fc son capaces de crear una asociación estable entre sí. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento comprende no más de un dominio Fc.

En un modo de realización, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG. En un modo de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1. En otro modo de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_4. En un modo de realización más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_4 que comprende una sustitución de aminoácido en la posición S228 (numeración UE), en particular la sustitución de aminoácido S228P. Esta sustitución de aminoácido reduce el intercambio *in vivo* del brazo Fab de anticuerpos IgG_4 (véase Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En un modo de realización particular adicional, el dominio Fc es humano. Una secuencia ejemplar de una región Fc de IgG_1 humana se proporciona en la SEQ ID NO: 149.

<u>Modificaciones del dominio Fc que promueven la heterodimerización</u>

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en la presente comprenden diferentes restos de unión a antígeno, fusionados a una u otra de las dos subunidades del dominio Fc, de modo que las dos subunidades del dominio Fc están típicamente comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización conduce a varias combinaciones posibles

de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T en la producción recombinante, será ventajoso introducir una modificación en el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

Por consiguiente, en modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de la interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por lo tanto, en un modo de realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un modo de realización específico, dicha modificación es una modificación llamada «botón en ojal» (del inglés «knob-into-hole»), que comprende una modificación de «botón» en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de «ojal» en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; en Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) y en Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia («botón») en la interfaz de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente («ojal») en la interfaz de un segundo polipéptido, de manera que la protuberancia se puede colocar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido por cadenas laterales mayores (p.ej. tirosina o triptófano). Las cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p.ej. alanina o treonina).

Por consiguiente, en un modo de realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor, generando de ese modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede colocar en una cavidad creada dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene un menor volumen de la cadena lateral, generando de ese modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad en la que se puede colocar la protuberancia creada dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

La protuberancia y la cavidad se pueden obtener alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica de sitio o mediante síntesis de péptidos.

En un modo de realización específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza por un residuo de valina (Y407V). En un modo de realización, en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza por un residuo de alanina (L368A).

En aún otro modo de realización adicional, en la primera subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza por un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza por un residuo de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, estabilizando adicionalmente el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno capaz de unirse a un antígeno activador de linfocitos T se fusiona (opcionalmente a través del resto de unión a antígeno capaz de unirse a un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación «botón»). Sin pretender imponer ninguna teoría, la fusión del resto de unión a antígeno capaz de unirse a un antígeno activador de linfocitos T a la subunidad del dominio Fc que contiene el botón minimizará (adicionalmente) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos restos de unión a antígeno capaces de unirse a un antígeno activador de los linfocitos T (choque estérico de dos polipéptidos que contienen un botón).

En un modo de realización alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación en la que median efectos de orientación por interacción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc por residuos de aminoácido cargados, de modo que la formación del homodímero se vuelve electrostáticamente desfavorable, mientras que la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

<u>Modificaciones del dominio Fc que reducen la función efectora y/o la unión al receptor Fc</u>

El dominio Fc confiere propiedades farmacocinéticas favorables a la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, que incluyen una prolongada semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y a una proporción favorable de distribución tejido-sangre. Al mismo tiempo, sin embargo, puede provocar que la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se dirija de manera indeseable a células que expresan receptores de Fc en lugar de a células portadoras de antígenos preferentes. Además, la coactivación de las vías de señalización del receptor Fc puede conducir a la liberación de citocinas que, en combinación con las propiedades de activación de linfocitos T y la larga semivida de la molécula de unión al antígeno, provoca una activación excesiva de los receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica. La activación de células inmunitarias (que portan el receptor Fc) distintas de los linfocitos T puede incluso reducir la eficacia de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T debido a la posible destrucción de los linfocitos T, por ejemplo, mediante células NK.

Por consiguiente, en modos de realización particulares, el dominio Fc de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento muestra una afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 natural. En uno de dichos modos de realización, el dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión al antígeno activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) exhibe menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 natural (o una molécula biespecífica de unión al antígeno activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG_1 natural), y/o menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio dominio Fc de IgG_1 natural (o una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG_1 natural). En un modo de realización, el dominio dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor Fc y/o no induce sustancialmente una función efectora. En un modo de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En un modo de realización, el receptor Fc es un receptor Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano activador, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. En un modo de realización, la función efectora es una o más seleccionadas entre el grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En un modo de realización particular, la función efectora es ADCC. En un modo de realización, el dominio dominio Fc exhibe una afinidad de unión sustancialmente similar por el receptor Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio Fc de IgG_1 natural. Se logra una unión sustancialmente similar a FcRn cuando el dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) exhibe más de aproximadamente un 70 %, particularmente más de aproximadamente un 80 %, más particularmente más de aproximadamente un 90 % de la unión afinidad de un dominio Fc de IgG_1 natural (o de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG_1 natural) por FcRn.

En ciertos modos de realización, el dominio Fc se genomanipula para que tenga afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. En modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc y/o la función efectora. Típicamente, la misma de una o más mutaciones de aminoácidos está presente en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En un modo de realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc. En un modo de realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En modos de realización en los que hay más de una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor Fc, la combinación de estas mutaciones de aminoácidos puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc genomanipulado exhibe menos de un 20 %, particularmente menos de un 10 %, más particularmente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor Fc en comparación con una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado. En un modo de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En algunos modos de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En algunos modos de realización, el receptor Fc es un receptor Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano activador, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunos modos de realización también se reduce la afinidad de unión por un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión por C1q. En un modo de realización, la afinidad de unión por el receptor Fc neonatal (FcRn) no se reduce. Se consigue una unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, preservación de la afinidad de unión del dominio Fc por dicho receptor, cuando el dominio Fc (o la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) exhibe más de aproximadamente un 70 % de la unión afinidad de una forma no genomanipulada del dominio Fc (o de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende dicha forma no genomanipulada del dominio Fc) por FcRn. El dominio Fc, o las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento que comprenden dicho dominio

Fc, pueden exhibir más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. En ciertos modos de realización, el dominio Fc de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se genomanipula para que tenga una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, absorción de antígeno mediada por complejos inmunitarios por células presentadoras de antígenos reducida, unión a células NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa inductora de apoptosis reducida, entrelazamiento de anticuerpos unidos a diana reducido, maduración de células dendríticas reducida o sensibilización de linfocitos T reducida. En un modo de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas entre el grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción de citocinas reducida. En un modo de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En un modo de realización, la ADCC reducida es inferior a un 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no genomanipulado (o una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado).

En un modo de realización, la mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc y/o función efectora es una sustitución de aminoácido. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada entre el grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329. En un modo de realización más específico, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada entre el grupo de L234, L235 y P329. En algunos modos de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A. En uno de dichos modos de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1, particularmente un dominio Fc de IgG_1 humana. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329. En un modo de realización más específico, la sustitución de aminoácido es P329A o P329G, particularmente P329G. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329 y una sustitución de aminoácido adicional en una posición seleccionada entre E233, L234, L235, N297 y P331. En un modo de realización más específico, la sustitución de aminoácido adicional es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones P329, L234 y L235. En modos de realización más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G («P329G LALA»). En uno de dichos modos de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1, particularmente un dominio Fc de IgG_1 humana. La combinación «P329G LALA» de sustituciones de aminoácidos suprime casi completamente la unión al receptor Fcγ de un dominio Fc de IgG_1 humana, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2012/130831. El documento WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades tales como la unión al receptor Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG_4 exhiben una afinidad de unión reducida por los receptores Fc y reducidas funciones efectoras, en comparación con los anticuerpos IgG_1. Por lo tanto, en algunos modos de realización, el dominio Fc de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento es un dominio Fc de IgG_4, particularmente un dominio Fc de IgG_4 humana. En un modo de realización, el dominio Fc de IgG_4 comprende las sustituciones de aminoácidos en la posición S228, específicamente la sustitución de aminoácido S228P. Para reducir aún más su afinidad de unión por un receptor Fc y/o su función efectora, en un modo de realización, el dominio Fc de IgG_4 comprende una sustitución de aminoácido en la posición L235, específicamente la sustitución de aminoácido L235E. En otro modo de realización, el dominio Fc de IgG_4 comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329, específicamente la sustitución de aminoácido P329G. En un modo de realización particular, el dominio Fc de IgG_4 comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y P329G. Dichos mutantes de dominio Fc de IgG_4 y sus propiedades de unión al receptor Fcγ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831.

En un modo de realización particular, el dominio Fc que exhibe una afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 natural, es un dominio Fc de IgG_1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y, opcionalmente, P329G, o un dominio Fc de IgG_4 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y, opcionalmente, P329G.

En ciertos modos de realización, se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En uno de dichos modos de realización, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácido en la posición N297, particularmente una sustitución de aminoácido que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, dominios Fc con reducida unión al receptor Fc y/o función efectora reducida también incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 del dominio Fc (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc «DANA» con la sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Los dominios de Fc mutantes se pueden preparar por eliminación, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos

usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis de genes y similares. Los cambios de nucleótidos correctos se pueden verificar, por ejemplo, mediante secuenciación.

La unión a los receptores Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA, o Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. Uno de dichos ensayos de unión adecuados se describe en el presente documento. De forma alternativa, la afinidad de unión de los dominios Fc o de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T que comprenden un dominio Fc por los receptores Fc se puede evaluar usando líneas celulares conocidas por expresar receptores Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan el receptor FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc, se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Un ensayo adecuado para medir ADCC se describe en el presente documento. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362, en Hellstrom, I. et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y en Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo,* por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

En algunos modos de realización se reduce la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q. Por consiguiente, en algunos modos de realización en los que el dominio Fc está genomanipulado para tener una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Los ensayos de unión a C1q se pueden llevar a cabo para determinar si la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T es capaz de unirse a C1q y, por lo tanto, tiene actividad de CDC. Véase, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Restos de unión a antígeno

La molécula de unión a antígeno divulgada en el presente documento es biespecífica, es decir, comprende al menos dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos. De acuerdo con la presente divulgación, los restos de unión a antígeno son moléculas de Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos por una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo cada uno de ellos una región variable y una región constante). En un modo de realización, dichas moléculas Fab son humanas. En otro modo de realización, dichas moléculas Fab están humanizadas. En aún otro modo de realización, dichas moléculas Fab comprenden regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas.

Al menos uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab de cadena única o una molécula Fab entrecruzada. Dichas modificaciones evitan el emparejamiento incorrecto de cadenas pesadas y ligeras de diferentes moléculas de Fab, mejorando de ese modo el rendimiento y la pureza de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento en la producción recombinante. En una molécula Fab de cadena única particular útil para la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento, el extremo C de la cadena ligera Fab está conectado al extremo N de la cadena pesada Fab mediante un conector peptídico. El conector peptídico permite la disposición de la cadena pesada y ligera Fab para formar un resto de unión a antígeno funcional. Los conectores peptídicos adecuados para conectar la cadena pesada y ligera de Fab incluyen, por ejemplo, $(G_4S)_6$-GG (SEQ ID NO: 152) o $(SG_3)_2$-$(SEG_3)_4$-(SG_3)-SG (SEQ ID NO: 153). En una molécula Fab entrecruzada particular útil para la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento, las regiones constantes de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están intercambiadas. En otra molécula Fab entrecruzada particular útil para la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento, las regiones variables de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están intercambiadas.

En un modo de realización particular, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T es capaz de unirse simultáneamente a un antígeno de célula diana, particularmente un antígeno de célula tumoral, y a un antígeno activador de linfocitos T. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T es capaz de entrelazar un linfocito T y una célula diana mediante la unión simultánea a un antígeno de célula diana y a un antígeno activador de linfocitos T. En un modo de realización incluso más particular, dicha unión simultánea da como resultado la lisis de la célula diana, particularmente una célula tumoral. En un modo de realización, dicha unión simultánea da como resultado la activación del linfocito T. En otros modos de realización, dicha unión

simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico, seleccionado entre el grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. En un modo de realización, la unión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T al antígeno activador de linfocitos T sin la unión simultánea al antígeno de la célula diana no da como resultado la activación del linfocito T.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T es capaz de redirigir la actividad citotóxica de un linfocito T a una célula diana. En un modo de realización particular, dicho redireccionamiento es independiente de la presentación de antígenos peptídicos mediada por MHC por parte de la célula diana y/o de la especificidad del linfocito T.

Particularmente, un linfocito T de acuerdo con cualquiera de los modos de realización de la presente divulgación es un linfocito T citotóxico. En algunos modos de realización, el linfocito T es un linfocito T $CD4^+$ o $CD8^+$, particularmente un linfocito T $CD8^+$.

Resto de unión a antígeno activador de linfocitos T

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento comprende al menos un resto de unión a antígeno capaz de unirse a un antígeno activador de linfocitos T (también denominado en el presente documento «resto de unión a antígeno activador de linfocitos T»). En un modo de realización particular, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T proporciona una unión monovalente al antígeno activador de linfocitos T. El resto de unión a antígeno activador de linfocitos T puede ser una molécula Fab convencional o una molécula Fab modificada, es decir, una molécula Fab de cadena única o entrecruzada. En modos de realización en los que hay más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana comprendido en la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T es preferentemente una molécula Fab modificada.

En un modo de realización particular, el antígeno activador de linfocitos T es CD3, particularmente CD3 humano (SEQ ID NO: 265) o CD3 de macaco (SEQ ID NO: 266), los más particularmente CD3 humano. En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T tiene reactividad entrecruzada por (es decir, se une específicamente a) CD3 humano y de macaco. En algunos modos de realización, el antígeno activador de linfocitos T es la subunidad épsilon de CD3.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T puede competir con el anticuerpo monoclonal H2C (descrito en la publicación PCT n.º WO2008/119567) por la unión a un epítopo de CD3. En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T puede competir con el anticuerpo monoclonal V9 (descrito en Rodrigues et al., Int J Cancer Suppl 7, 45-50 (1992) y la patente de EE. UU. n.º 6.054.297) por la unión a un epítopo de CD3. En otro modo de realización más, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T puede competir con el anticuerpo monoclonal FN18 (descrito en Nooij et al., Eur J Immunol 19, 981-984 (1986)) por la unión a un epítopo de CD3. En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T puede competir con el anticuerpo monoclonal SP34 (descrito en Pessano et al., EMBO J 4, 337-340 (1985)) por la unión a un epítopo de CD3. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T se une al mismo epítopo de CD3 que el anticuerpo monoclonal SP34. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 163, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 165, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 167, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 171, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 173 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 175. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 169 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 177, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 249, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 251, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 253, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 257, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 259 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 261. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T puede competir por la unión a un epítopo de CD3 con un resto de unión a antígeno que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 249, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 251, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 253, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 257, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 259 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 261. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T se une al mismo epítopo de CD3 que un resto de unión a antígeno que comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 249, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 251, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 253, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 257, la CDR2

de la cadena ligera de SEQ ID NO: 259 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 261. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 255 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 263, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T puede competir por la unión a un epítopo de CD3 con un resto de unión a antígeno que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 255 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 263. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T se une al mismo epítopo de CD3 que un resto de unión a antígeno que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 255 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 263. En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T comprende una versión humanizada de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 255 y una versión humanizada de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 263. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno activador de linfocitos T comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 249, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 251, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 253, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 257, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 259, la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 261 y las secuencias estructurales de la región variable de la cadena pesada y ligera humanas.

Resto de unión a antígeno de célula diana

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento comprende al menos un resto de unión a antígeno capaz de unirse a un antígeno de célula diana (también denominado en el presente documento «resto de unión a antígeno de célula diana»). En ciertos modos de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende dos restos de unión a antígeno capaces de unirse a un antígeno de célula diana. En uno de dichos modos de realización particulares, cada uno de estos restos de unión a antígeno se une específicamente al mismo determinante antigénico. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende no más de dos restos de unión a antígeno capaces de unirse a un antígeno de célula diana. El resto de unión a antígeno de célula diana es, en general, una molécula Fab que se une a un determinante antigénico específico y que es capaz de dirigir a la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que posee el determinante antigénico.

En ciertos modos de realización, el resto de unión a antígeno de célula diana se dirige a un antígeno asociado con un estado patológico, tal como un antígeno presentado en una célula tumoral o en una célula infectada por virus. Los antígenos adecuados son antígenos de superficie celular, por ejemplo, pero sin limitación, receptores de superficie celular. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En un modo de realización específico, el antígeno de la célula diana se selecciona entre el grupo de proteína de activación de fibroblastos (FAP), proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD19, CD20 y CD33.

En modos de realización particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos un resto de unión a antígeno que es específico para el proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP). En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos uno, típicamente dos o más restos de unión a antígeno que pueden competir con el anticuerpo monoclonal LC007 (véase SEQ ID NO: 75 y 83, y publicación de solicitud de patente europea n.º EP 2748195) por la unión a un epítopo de MCSP. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 69, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 71, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 73, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 77, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 79 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 81. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 75 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 83, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En modos de realización particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos uno, típicamente dos o más restos de unión a antígeno que pueden competir con el anticuerpo monoclonal M4-3 ML2 (véase SEQ ID NO: 239 y 247, y publicación de solicitud de patente europea n.º EP 2748195) por la unión a un epítopo de MCSP. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP se une al mismo epítopo de MCSP que el anticuerpo monoclonal M4-3 ML2. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 233, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 235, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 237, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 241, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 243 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 245. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende una secuencia

de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %, particularmente un 98 %, un 99 % o un 100 %, idéntica a SEQ ID NO: 239 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %, particularmente un 98 %, un 99 % o un 100 %, idéntica a SEQ ID NO: 247, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una versión de afinidad madurada del anticuerpo monoclonal M4-3 ML2. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 239 con uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete, particularmente dos, tres, cuatro o cinco, sustituciones de aminoácidos; y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 247 con una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete, particularmente dos, tres, cuatro o cinco, sustituciones de aminoácidos. Cualquier residuo de aminoácido de las secuencias de la región variable se puede sustituir por un aminoácido diferente, incluyendo residuos de aminoácido de las regiones CDR, siempre que se conserve la unión a MCSP, particularmente a MCSP humano. Las variantes preferentes son aquellas que tienen una afinidad de unión por MCSP al menos igual (o más fuerte) a la afinidad de unión del resto de unión a antígeno que comprende las secuencias de región variable no sustituidas.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 3 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 7, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 9 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 11, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 13, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 15 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 17, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 19 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 21, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 23 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 25, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 27 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 29, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 31, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 29, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 3, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 35, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 3, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 37 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 39, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 3, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 41 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 29, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 3, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 179, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 29, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 181, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 23, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 183 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 185, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 23, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 183 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 187, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 189, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 191 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 193, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 183, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 189, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 193 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 195, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 189, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 193, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 199 y la secuencia polipeptídica de SEQ

ID NO: 201, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 23, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 215 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 217, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 23, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 215 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 219, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización específico, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 218 y SEQ ID NO: 220.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos un resto de unión a antígeno que es específico para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos uno, típicamente dos o más restos de unión a antígeno que pueden competir con el anticuerpo monoclonal GA201 por la unión a un epítopo de EGFR. Véase la publicación PCT WO 2006/082515. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para EGFR comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 85, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 87, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 89, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 93, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 95 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 97. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para EGFR comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 91 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 99, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En otro modo de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 43, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 45 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 47, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 49, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 51 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 11, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En otro modo de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 53, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 45 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 47, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización específico, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 12.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos un resto de unión a antígeno que es específico para la proteína de activación de fibroblastos (FAP). En otro modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos uno, típicamente dos o más restos de unión a antígeno que pueden competir con el anticuerpo monoclonal 3F2 por la unión a un epítopo de FAP. Véase la publicación PCT WO 2012/020006. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para FAP comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 101, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 103, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 105, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 109, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 111 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 113. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para FAP comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 107 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 115, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En otro modo de realización más, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 55, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 51 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 11, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización adicional, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 57, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 59 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 61, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización específico, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 12.

En modos de realización particulares, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos un resto de unión a antígeno que es específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA). En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos uno, típicamente dos o más restos de unión a antígeno que pueden competir con el anticuerpo monoclonal BW431/26 (descrito en la patente europea n.º EP 160 897 y en Bosslet et al. Int J Cancer 36, 75-84 (1985)) por la unión a un epítopo de CEA. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos uno, típicamente dos o más restos de unión a antígeno que pueden competir con el anticuerpo monoclonal CH1A1A (véase SEQ ID NO: 123 y 131) por la unión a un epítopo de CEA. Ver la publicación PCT n.º WO 2011/023787. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA se une al mismo epítopo de CEA que el anticuerpo monoclonal CH1A1A. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 117, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 119, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 121, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 125, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 127 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 129. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %, particularmente un 98 %, un 99 % o un 100 %, idéntica a SEQ ID NO: 123 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %, particularmente un 98 %, un 99 % o un 100 %, idéntica a SEQ ID NO: 131, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una versión de afinidad madurada del anticuerpo monoclonal CH1A1A. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 123 con uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete, particularmente dos, tres, cuatro o cinco, sustituciones de aminoácidos; y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 131 con una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete, particularmente dos, tres, cuatro o cinco, sustituciones de aminoácidos. Cualquier residuo de aminoácido de las secuencias de la región variable se puede sustituir por un aminoácido diferente, incluyendo residuos de aminoácido de las regiones CDR, siempre que se conserve la unión a CEA, particularmente CEA humano. Las variantes preferentes son aquellas que tienen una afinidad de unión por CEA al menos igual (o más fuerte) a la afinidad de unión del resto de unión a antígeno que comprende las secuencias de región variable no sustituidas.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 63, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 65, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 67 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 65, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 67, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 183 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 197, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 183, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 203, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 205 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 207, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 183, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 209, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 211 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 213, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización específico, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 208, SEQ ID

NO: 210, SEQ ID NO: 212 y SEQ ID NO: 214.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende al menos un resto de unión a antígeno que es específico para CD33. En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CD33 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 133, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 135, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 137, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 141, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 143 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 145. En un modo de realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para CD33 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 139 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 147, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 213, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 221 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 223, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 33, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 221, la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 223 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 225, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.

En un modo de realización específico, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo de SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224 y SEQ ID NO: 226.

Polinucleótidos

En el presente documento también se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma.

Los polinucleótidos divulgados en el presente documento incluyen aquellos que son al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idénticos a las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262 y 264, incluyendo fragmentos funcionales o variantes de los mismos.

Los polinucleótidos que codifican las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se pueden expresar como un único polinucleótido que codifica la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T completa o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T funcional. Por ejemplo, el segmento de cadena ligera de un resto de unión a antígeno puede estar codificado por un polinucleótido separado del segmento de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende el segmento de cadena pesada del resto de unión a antígeno, una subunidad de dominio Fc y, opcionalmente, (parte de) otro resto de unión a antígeno. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar el resto de unión a antígeno. En otro ejemplo, el segmento de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y, opcionalmente, (parte de) uno o más restos de unión a antígeno podría estar codificado por un polinucleótido separado del segmento de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende la la otra de las dos subunidades del dominio Fc y, opcionalmente, (parte de) un resto de unión a antígeno. Cuando se coexpresan, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En ciertos modos de realización, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica un fragmento de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, y un dominio Fc que consiste en dos subunidades, en la que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de cadena única. En un modo de realización, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica el primer resto de unión a antígeno y una subunidad del dominio Fc. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una molécula Fab de cadena única comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización,

un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica la cadena pesada del segundo resto de unión a antígeno y una subunidad del dominio Fc. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización más, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica el primer resto de unión a antígeno, la cadena pesada del segundo resto de unión a antígeno y una subunidad del dominio de Fc. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una molécula Fab de cadena única comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc.

En ciertos modos de realización, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica un fragmento de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, y un dominio Fc que consiste en dos subunidades, en la que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada. En un modo de realización, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica la cadena pesada del primer resto de unión a antígeno y una subunidad del dominio Fc. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica la cadena pesada del segundo resto de unión a antígeno y una subunidad del dominio Fc. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización más, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica la cadena pesada del primer resto de unión a antígeno, la cadena pesada del segundo resto de unión a antígeno y una subunidad del dominio de Fc. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una región variable de la cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una región variable de la cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización específico más, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región variable de la cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc. En otro modo de realización específico más, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región variable de la cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc.

En modos de realización adicionales, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica la cadena pesada de un tercer resto de unión a antígeno y una subunidad del dominio Fc. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc.

En modos de realización adicionales, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica la cadena ligera de un resto de unión a antígeno. En algunos modos de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una región variable de la cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena pesada Fab. En otros modos de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una región variable de la cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena ligera Fab. En otros modos de realización más, un polinucleótido aislado divulgado en el presente documento codifica la cadena ligera del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera del segundo resto de unión a antígeno. En un modo de realización más específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una región variable de la cadena pesada Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una cadena ligera Fab. En otro modo de realización específico, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región variable de la cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena ligera Fab. En otro modo de realización específico más, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una región variable de la cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena pesada Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una cadena ligera Fab. En otro modo de realización específico más, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido en el que una cadena ligera Fab comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región variable de la cadena ligera Fab, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una región constante de la cadena pesada Fab.

En otro modo de realización, la presente divulgación está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de región variable como se muestra en las SEQ ID NO: 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 169, 177, 239, 247, 255 y 263. En otro modo de realización, la presente divulgación está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T o fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica como se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 y 231. En otro modo de realización, la presente divulgación está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262 o 264. En otro modo de realización, la presente divulgación está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico mostrada en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262 o 264. En otro modo de realización, la presente divulgación está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de región variable que es al menos aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos en las SEQ ID NO: 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 169, 177, 239, 247, 255 o 263. En otro modo de realización, la presente divulgación está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T o fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 o 231. La presente divulgación abarca un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia de región variable de SEQ ID NO: 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 169, 177, 239, 247, 255 o 263 con sustituciones conservadoras de aminoácidos. La divulgación también abarca un polinucleótido aislado que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 o 231 con sustituciones conservadoras de aminoácidos.

En ciertos modos de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un polinucleótido divulgado en el presente documento es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN divulgado en el presente documento puede ser monocatenario o bicatenario.

Procedimientos recombinantes

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se pueden obtener, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, se aísla uno o más polinucleótidos que codifican la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T (fragmento, por ejemplo, como se describe anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la posterior clonación y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un modo de realización se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos divulgados en el presente documento. Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T (fragmento) junto con señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas

sintéticas y recombinación genética/recombinación *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que el polinucleótido que codifica la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T (fragmento) (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción. Como se usa en el presente documento, una «región codificante» es un segmento de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un «codón de parada» (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar como parte de una región codificante, si está presente, mientras que cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de la transcripción, intrones, regiones 5' y 3' no traducidas y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones de polinucleótidos separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector divulgado en el presente documento puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan después de o durante la traducción en las proteínas finales por escisión proteolítica. Además, un vector, un polinucleótido o un ácido nucleico divulgado en el presente documento puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionadas o no fusionadas a un polinucleótido que codifica la molécula biespecífica de unión al antígeno activadora de linfocitos T (fragmento) divulgada en el presente documento, o una variante o derivado de la misma. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo. Una asociación funcional se produce cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal manera que la expresión del producto génico queda bajo la influencia o el control de la o las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado) están «asociados de forma funcional» si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere en la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico o en la capacidad de la plantilla de ADN que se va a transcribir. Por lo tanto, una región promotora estaría asociada de forma funcional a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de la célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional al polinucleótido para dirigir la transcripción específica de la célula. En el presente documento se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados, tales como, pero sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con el intrón A), virus 40 de simio (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tal como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen los derivados de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y alfa-globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De manera similar, los expertos en la técnica conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y de terminación de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (particularmente un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otras características tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (ITR) de virus adenoasociados (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos divulgadas en el presente documento se pueden asociar a regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido divulgado en el presente documento. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, el ADN que codifica una secuencia señal se puede colocar en dirección ' del ácido nucleico que codifica una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento o un fragmento de la misma. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrados tienen, en general, un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o «madura» del polipéptido. En ciertos modos de realización se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado de forma funcional al mismo. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal heterólogo de mamífero, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural puede estar sustituida con la secuencia líder de activador de plasminógeno tisular humano (TPA) o de β-glucuronidasa de ratón. Las secuencias ejemplares

de aminoácidos y polinucleótidos de los péptidos señal secretores se proporcionan en las SEQ ID NO: 154-162.

El ADN que codifica una secuencia de proteína corta que se podría usar para facilitar la purificación posterior (por ejemplo, un marcador de histidina) o para ayudar a marcar la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se puede incluir dentro o en los extremos de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T (fragmento) que codifica el polinucleótido.

En un modo de realización adicional se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos divulgados en el presente documento. En ciertos modos de realización se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores divulgados en el presente documento. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, divulgadas en el presente documento en relación con los polinucleótidos y vectores, respectivamente. En uno de dichos modos de realización, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término «célula hospedadora» se refiere a cualquier tipo de sistema celular que se puede manipular genéticamente para generar las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento o fragmentos de las mismas. Las células hospedadoras adecuadas para la replicación y para soportar la expresión de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o transducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala con el fin de obtener cantidades suficientes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T para aplicaciones clínicas. Las células hospedadoras adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden producir en bacterias, en particular cuando la glucosilación no es necesaria. Después de la expresión, el polipéptido se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, por ejemplo, los hongos filamentosos o las levaduras, son hospedadores adecuados de clonación o expresión para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glucosilación se han «humanizado», lo que da como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) y Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar en combinación con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células de plantas también se pueden usar como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas). Las células de vertebrados también se pueden usar como hospedadores. Pueden ser útiles, por ejemplo, líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor de mama de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather et al., Annals NY Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células hospedadoras de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)) y líneas celulares de mieloma tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de algunas líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003). Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal cultivado. En un modo de realización, la célula hospedadora es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20).

Las tecnologías estándar para expresar genes extraños en estos sistemas son conocidas en la técnica. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o la cadena ligera de un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo, se pueden genomanipular para expresar también la otra de las cadenas de anticuerpo de modo que el producto expresado sea un anticuerpo que tiene tanto una cadena pesada como una cadena ligera.

En un modo de realización se proporciona un procedimiento para producir una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica la molécula biespecífica de unión a

antígeno activadora de linfocitos T, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, y la recuperación de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la célula hospedadora (o del medio de cultivo de la célula hospedadora).

Los componentes de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T están genéticamente fusionados entre sí. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se puede diseñar de manera que sus componentes se fusionen directamente entre sí o indirectamente a través de una secuencia conectora. La composición y la longitud del conector se pueden determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica y se puede someter a ensayo su eficacia. En las secuencias proporcionadas en el presente documento se encuentran ejemplos de secuencias conectoras entre los diferentes componentes de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T. Si se desea, también se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa.

En ciertos modos de realización, el uno o más restos de unión a antígeno de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T comprenden al menos una región variable de anticuerpo capaz de unirse a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos naturales y no naturales y fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, «Antibodies, a laboratory manual», Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de manera recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, seleccionando bibliotecas combinatorias que comprendan cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 de McCafferty).

En las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se puede usar cualquier especie animal de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o región variable. Los anticuerpos no limitantes, fragmentos de anticuerpos, dominios de unión a antígeno o regiones variables útiles en el presente documento pueden ser de origen murino, primate o humano. Si la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T está destinada al uso en seres humanos, se puede usar una forma quimérica de anticuerpo en la que las regiones constantes del anticuerpo proceden de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o totalmente humana del anticuerpo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 de Winter). La humanización se puede lograr mediante diversos procedimientos que incluyen, pero no se limitan a (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en las regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de residuos estructurales críticos (por ejemplo, los que son importantes para conservar una buena afinidad de unión al antígeno o funciones de anticuerpos), (b) injertar únicamente las regiones determinantes de la especificidad (SDR o a-CDR, los residuos críticos para la interacción anticuerpo-antígeno) no humanas en las regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero «enmascararlos» con una sección de tipo humano mediante el reemplazo de los residuos superficiales. Los anticuerpos humanizados y los procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (que describe el «rebarnizado»); Dall'Acqua et al., Methods 36, 43-60 (2005) (que describe la «mezclado de FR»); y Osbourn et al., Methods 36, 61-68 (2005) y Klimka et al., Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (que describen la estrategia de «selección guiada» para el mezclado de FR). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) y Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos preparados mediante el procedimiento del hibridoma (véase, por ejemplo, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas se pueden preparar también administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005)). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas también se pueden generar aislando secuencias de la región variable del clon Fv seleccionadas en bibliotecas de presentación de fagos derivadas de seres humanos (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al. en Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y McCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)). Los fagos típicamente presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv de cadena única (scFv) o como fragmentos Fab.

En ciertos modos de realización, los restos de unión a antígeno útiles en el presente documento se genomanipulan para que tengan una afinidad de unión mejorada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la

publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132066. La capacidad de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Los ensayos de competencia se pueden usar para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compite con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular, por ejemplo, un anticuerpo que compite con el anticuerpo V9 por la unión a CD3. En ciertos modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) al que está unido el anticuerpo de referencia. Ejemplos de procedimientos detallados para la cartografía de un epítopo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) «Epitope Mapping Protocols», en Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ejemplo de ensayo de competencia, el antígeno inmovilizado (por ejemplo, CD3) se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo, anticuerpo V9) y un segundo anticuerpo no marcado cuya capacidad de competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno se está sometiendo a prueba. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, el antígeno inmovilizado se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado al antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado al antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T preparadas como se describe en el presente documento se pueden purificar mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, la hidrofobicidad, la hidrofilicidad, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se una la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. La cromatografía de afinidad de proteína A o G secuencial y la cromatografía de exclusión por tamaño se pueden usar para aislar una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T esencialmente como se describe en los Ejemplos. La pureza de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se puede determinar por cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos que incluyen electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la cadena pesada expresadas como se describe en los Ejemplos se muestran intactas y se ensamblan apropiadamente, como se demuestra reduciendo la SDS-PAGE (véase, por ejemplo, la Figura 2). Las tres bandas se resolvieron a aproximadamente Mr 25 000, Mr 50 000 y Mr 75 000, que corresponden a las masas moleculares predichas de la proteína de cadena ligera, la cadena pesada y de fusión de cadena pesada/ligera de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T.

Ensayos

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T por un receptor Fc o un antígeno diana se puede determinar de acuerdo con los procedimientos expuestos en los Ejemplos mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare) y receptores o proteínas diana tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, la unión de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T para diferentes receptores o antígenos diana se puede evaluar usando líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). Un modo de realización ilustrativo y ejemplar específico para medir la afinidad de unión se describe a continuación y en los Ejemplos siguientes.

De acuerdo con un modo de realización, K_D se mide mediante resonancia de plasmón superficial usando un equipo BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

Para analizar la interacción entre el segmento Fc y los receptores Fc, el receptor Fc recombinante marcado con His lo capturaun anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) inmovilizado sobre chips CM5 y las construcciones biespecíficas se usan como analitos. En resumen, los chips biodetectores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan

con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El anticuerpo anti-Penta-His se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, a 40 µg/ml antes de la inyección a una caudal de 5 µl/min para conseguir aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Posteriormente, el receptor Fc se captura durante 60 s a 4 o 10 nM. Para realizar mediciones cinéticas, diluciones cuádruples en serie de la construcción biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) se inyectan en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.

Para determinar la afinidad por el antígeno diana, las construcciones biespecíficas se capturan por un anticuerpo específico anti-Fab humano (GE Healthcare) que está inmovilizado sobre una superficie activada de chips detectores CM5, como se describe para el anticuerpo anti-Penta-His. La cantidad final de proteína acoplada es es de aproximadamente 12 000 UR. Las construcciones biespecíficas se capturan durante 90 s a 300 nM. Los antígenos diana se pasan a través de las cubetas de lectura durante 180 s en un intervalo de concentración de 250 a 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. La disociación se monitoriza durante 180 s.

Las diferencias en el índice de refracción masivo se corrigen restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. La respuesta en estado estacionario se usó para derivar la constante de disociación K_D mediante ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Las tasas de asociación (k_{as}) y tasas de disociación (k_{dis}) se calculan usando un modelo simple individualizado de unión de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE® T100, versión 1.1.1) mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y de disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as}. Véase, por ejemplo, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

La actividad biológica de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se puede medir mediante diversos ensayos, como se describe en los Ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de proliferación de linfocitos T, la inducción de señalización en linfocitos T, la inducción de expresión de marcadores de activación en linfocitos T, la inducción de secreción de citocinas por linfocitos T, la inducción de lisis de células diana tales como células tumorales, y la inducción de regresión del tumor y/o de mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos siguientes. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T proporcionadas el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T proporcionadas el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Se proporciona además un procedimiento para producir una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento en una forma adecuada para la administración *in vivo*, comprendiendo el procedimiento (a) obtener una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento, y (b) formular la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, por lo que se formula una preparación de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T para administración *in vivo*.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T disueltas o dispersadas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases «farmacéutica o farmacológicamente aceptable» se refieren a entidades moleculares y composiciones que, en general, no son tóxicas para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, es decir, no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones perjudiciales cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según corresponda. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T y, opcionalmente, un ingrediente activo adicional será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como lo ejemplifica Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración en animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo requerido por la Oficina de Normas Biológicas de la FDA o las autoridades correspondientes de otros países. Las composiciones preferentes son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, «vehículo farmacéuticamente aceptable» incluye cualquiera y todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes

antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizadores de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como conocerá un experto en la técnica (véase, para ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol, y si debe ser estéril para dichas vías de administración tales como la inyección. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar de forma intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intraesplénica, intramuscular, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravitreal, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando directamente las células diana, a través de un catéter, a través de un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o mediante otro procedimiento o cualquier combinación de los anteriores, como sabrá un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª ed. Mack Printing Company). La administración parenteral, en particular la inyección intravenosa, se usa lo más comúnmente posible para administrar moléculas polipeptídicas tales como las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para la administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. De forma alternativa, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T pueden estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril apirógena, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados a continuación, según se requiera. La esterilidad se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío o liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de un medio líquido filtrado previamente de forma estéril del mismo. El medio líquido se debe tamponar adecuadamente en caso necesario, y el diluyente líquido se vuelve primero isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación con endotoxinas se debe minimizar a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener compuestos que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.ª ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación

sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En modos de realización particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T también se pueden formular como una preparación de medicamentos de liberación retardada. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se pueden fabricar mediante procedimientos convencionales de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T se pueden formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que conservan sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteinácea, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

Procedimientos y composiciones terapéuticas

Cualquiera de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento se puede usar en procedimientos terapéuticos. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T como se divulgan en el presente documento se pueden usar como agentes inmunoterápicos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

Para su uso en procedimientos terapéuticos, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con una buena práctica médica. Los factores que se deben considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se vaya a tratar, el mamífero particular que se vaya a tratar, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

En un aspecto se proporcionan moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T como se divulgan en el presente documento para su uso como medicamento. En aspectos adicionales se proporcionan moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T como se divulgan en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En ciertos modos de realización se proporcionan moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T como se divulgan en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento. En un modo de realización se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En ciertos modos de realización se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T para su uso en un procedimiento para tratar a un individuo que tiene una enfermedad que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T. En ciertos modos de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En ciertos modos de realización, el procedimiento comprende además la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En modos de realización adicionales se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T tal como se divulga en el presente documento para su uso en la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En ciertos modos de realización se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T para su uso en un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T para inducir la lisis de una célula diana. Un «individuo» de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es, preferentemente,

un ser humano.

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporciona el uso de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En un modo de realización adicional, el medicamento está destinado al uso en un procedimiento para tratar una enfermedad, que comprende la administración a un individuo que tiene la enfermedad de una cantidad eficaz del medicamento. En ciertos modos de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En un modo de realización, el procedimiento comprende además la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En un modo de realización adicional, el medicamento está destinado a la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En otro modo de realización más, el medicamento está destinado al uso en un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del medicamento para inducir la lisis de una célula diana. Un «individuo» de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser, preferentemente, un ser humano.

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad. En un modo de realización, el procedimiento comprende la administración a un individuo que tiene dicha enfermedad de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento. En un modo de realización se administra una composición a dicho individuo, que comprende la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento en una forma farmacéuticamente aceptable. En ciertos modos de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En ciertos modos de realización, el procedimiento comprende además la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. Un «individuo» de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser, preferentemente, un ser humano.

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporciona un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En un modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto una célula diana con una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento en presencia de un linfocito T, particularmente un linfocito T citotóxico. En un aspecto adicional se proporciona un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T para inducir la lisis de una célula diana. En un modo de realización, un «individuo» es un ser humano.

En ciertos modos de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo, particularmente cáncer. Ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer broncopulmonar, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer cervicouterino, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer gástrico, cáncer de próstata, neoplasia hemática, cáncer de piel, carcinoma escamocelular, cáncer de huesos y cáncer de riñón. Otros trastornos de proliferación celular que se pueden tratar usando una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento incluyen, pero no están limitados a, neoplasias localizadas en abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, región torácica y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis de cáncer. En ciertos modos de realización, el cáncer se elige entre el grupo que consiste en cáncer de células renales, cáncer de piel, cáncer broncopulmonar, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello. Un experto en la técnica reconoce fácilmente que, en muchos casos, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T puede no proporcionar una cura, sino que solo puede proporcionar un beneficio parcial. En algunos modos de realización, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por lo tanto, en algunos modos de realización, una cantidad de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que proporciona un cambio fisiológico se considera una «cantidad eficaz» o una «cantidad terapéuticamente eficaz». El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunos modos de realización se administra una cantidad eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento a una célula. En otros modos de realización se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento a un individuo para el tratamiento de la enfermedad.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento (cuando se usa sola o en combinación con

uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, de la vía de administración, del peso corporal del paciente, del tipo de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se administra con fines preventivos o terapéuticos, de intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, de la anamnesis del paciente y de la respuesta a la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, y del criterio del médico especialista. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente o ingredientes activos en una composición y la dosis apropiada para el sujeto individual. En el presente documento se contemplan varios programas de dosificación incluyendo, pero no limitados a, administraciones individuales o múltiples en varios puntos temporales, administración en bolo e infusión pulsada.

La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración al paciente puede ser de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg) de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T estaría en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, hasta aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de las cifras enumeradas en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., basándose en las cifras descritas anteriormente. Por lo tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T). Se puede administrar una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. La evolución de este tratamiento se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se usarán, en general, en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Para su uso para tratar o prevenir una enfermedad, las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento, o sus composiciones farmacéuticas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular entonces en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluye la CI_{50} como se determina en un cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

Las dosificaciones iniciales también se pueden estimar a partir *de* datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

La cantidad de dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones habituales de pacientes para administración por inyección varían de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces administrando múltiples dosis cada día. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante HPLC.

En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Alguien con

experiencia en la técnica podrá optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin excesiva experimentación.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento proporcionará, en general, un beneficio terapéutico sin causar una toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivo celular o animales experimentales. Los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales se pueden utilizar para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de una población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción DL_{50}/DE_{50}. Son preferentes las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T que exhiben índices terapéuticos grandes. En un modo de realización, la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento exhibe un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis adecuado para su uso en seres humanos. La dosificación se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con escasa o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, la afección del sujeto y similares. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación las puede elegir el médico individual a la vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, cap. 1, pág. 1).

El médico especialista de los pacientes tratados con moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similares. Por el contrario, el médico especialista también sabría ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno de interés variará en función de la gravedad de la afección que se va a tratar, de la vía de administración, y similares. La gravedad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, mediante procedimientos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis también variarán en función de la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento se pueden administrar en combinación con uno o más agentes diferentes en el tratamiento. Por ejemplo, una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. El término «agente terapéutico» abarca cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesita dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. En ciertos modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular o un agente que aumenta la sensibilidad de las células a los inductores apoptóticos. En un modo de realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un perturbador de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, un intercalador de ADN, un agente alquilante, un tratamiento hormonal, un inhibidor de cinasas, un antagonista de receptores, un activador de la apoptosis de células tumorales, o un agente antiangiogénico.

Dichos otros agentes están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T utilizada, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T se usan, en general, en las mismas dosis y por las vías de administración que se describen en el presente documento, o de aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosis descritas en el presente documento, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente como apropiada.

Dichos tratamientos combinados indicados anteriormente abarcan la administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en composiciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T divulgada en el presente documento se puede producir antes de, simultáneamente y/o después de la administración del agente y/o adyuvante terapéutico adicional. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T divulgadas en el presente documento también se pueden usar en combinación con radioterapia.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen,

por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o en combinación con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T como se divulga en el presente documento; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este modo de realización puede comprender además un prospecto que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicional, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Procedimientos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de AND

Las secuencias de ADN se determinaron por secuenciación de doble cadena.

Síntesis de genes

Los segmentos génicos deseados, cuando se requirieron, se generaron por PCR utilizando plantillas apropiadas o se sintetizaron por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis genética automatizada. En los casos en que no estaba disponible una secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores de oligonucleótidos basados en las secuencias de los homólogos más cercanos y los genes se aislaron mediante RT-PCR a partir del ARN que se originaba en el tejido apropiado. Los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singular se clonaron en vectores de clonación/secuenciación estándar. El ADN plasmídico se purificó a partir de bacterias transformadas y la concentración se determinó mediante espectroscopía UV. La secuencia de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmó por secuenciación de ADN. Los segmentos génicos se diseñaron con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Todas las construcciones se diseñaron con una secuencia de ADN en el extremo 5' que codifica un péptido líder dirige las proteínas para la secreción en células eucariotas. Las SEQ ID NO: 154-162 proporcionan ejemplos de péptidos líder y de secuencias de polinucleótidos que los codifican, respectivamente.

Aislamiento de linfocitos pan T humanos primarios a partir de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad Histopaque a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidas (capas leucocíticas) obtenidas de bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. En resumen, la sangre se diluyó con PBS estéril y se superpuso cuidadosamente sobre un gradiente Histopaque (Sigma, H8889). Después de la centrifugación durante 30 minutos a 450 x g a temperatura ambiente (freno desconectado), se descartó la parte del plasma situada por encima de la interfase que contenía PBMC. Las PBMC se transfirieron a nuevos tubos Falcon de 50 ml y los tubos se rellenaron con PBS hasta un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 x g (freno activado). El sobrenadante se descartó y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 350 x g). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en un medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al

1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, 5 % de CO_2 en la incubadora hasta el inicio del ensayo.

El enriquecimiento de linfocitos T a partir de PBMC se realizó usando el kit de aislamiento de linfocitos pan T II (Miltenyi Biotec n.º 130-091-156), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sedimentos celulares se diluyeron en 40 µl de tampón frío por cada 10 millones de células (PBS con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM, filtrado de forma estéril) y se incubaron con 10 µl de cóctel de biotina-anticuerpo por cada 10 millones de células durante 10 min a 4 °C. Se añadieron 30 µl de tampón frío y 20 µl de perlas magnéticas anti-biotina por cada 10 millones de células, y la mezcla se incubó durante otros 15 minutos a 4 °C. Las células se lavaron añadiendo 10-20 veces el volumen de ese momento y una etapa de centrifugación posterior a 300 x g durante 10 min. Se resuspendieron hasta 100 millones de células en 500 µl de tampón. La separación magnética de los linfocitos pan T humanos no marcados se realizó usando columnas LS (Miltenyi Biotec n.º 130-042-401) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de linfocitos T resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en medio AIM-V a 37 °C, 5 % de CO_2 en la incubadora hasta el inicio del ensayo (no más de 24 h).

Aislamiento de linfocitos T indiferenciados humanos primarios a partir de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad Histopaque a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidas (capas leucocíticas) obtenidas de bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. El enriquecimiento de linfocitos T a partir de PBMC se realizó utilizando el kit de aislamiento de linfocitos T $CD8^+$ indiferenciados de Miltenyi Biotec (n.º 130-093-244) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero omitiendo la última etapa de aislamiento de linfocitos T $CD8^+$ (véase también la descripción para el aislamiento de linfocitos pan T humanos primarios).

Aislamiento de linfocitos pan T murinos a partir de esplenocitos

Se aislaron los bazos de ratones C57BL/6, se transfirieron a un tubo C GentleMACS (Miltenyi Biotech n.º 130-093-237) que contenía tampón MACS (PBS + BSA al 0,5 % + EDTA 2 mM) y se disociaron con el Disociador GentleMACS para obtener suspensiones de células individuales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La suspensión celular se pasó a través de un filtro de separación previa para eliminar las partículas de tejido no disociadas restantes. Después de la centrifugación a 400 x g durante 4 min a 4 °C, se añadió tampón de lisis ACK para lisar los glóbulos rojos (incubación durante 5 min a temperatura ambiente). Las células restantes se lavaron con tampón MACS dos veces, se contaron y se usaron para el aislamiento de linfocitos pan T murinos. La selección negativa (magnética) se realizó usando el kit de aislamiento de linfocitos pan T de Miltenyi Biotec (n.º 130-090-861), siguiendo las instrucciones del fabricante. La población de linfocitos T resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos adicionales.

Aislamiento de PBMC primarias de macaco a partir de sangre heparinizada

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon por centrifugación por densidad a partir de sangre fresca de macacos donantes sanos, de la siguiente manera: La sangre heparinizada se diluyó 1:3 con PBS estéril, y el medio Lymphoprep (Axon Lab n.º 1114545) se diluyó al 90 % con PBS estéril. Dos volúmenes de la sangre diluida se colocaron en capas sobre un volumen del gradiente de densidad diluido y la fracción de PBMC se separó por centrifugación durante 30 min a 520 x g, sin freno, a temperatura ambiente. La banda de PBMC se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml nuevo y se lavó con PBS estéril mediante centrifugación durante 10 min a 400 x g a 4 °C. Se realizó una centrifugación a baja velocidad para eliminar las plaquetas (15 min a 150 x g, 4 °C), y la población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos adicionales.

Células diana

Para la evaluación de moléculas biespecíficas de unión a antígeno dirigidas a MCSP se usaron las siguientes líneas celulares tumorales: la línea celular de melanoma humano WM266-4 (ATCC n.º CRL-1676), derivada de un sitio metastásico de un melanoma maligno y que expresaba altos niveles de MCSP humano; y la línea celular de melanoma humano MV-3 (un amable obsequio de The Radboud University Nijmegen Medical Center), que expresaba niveles medios de MCSP humano.

Para la evaluación de moléculas biespecíficas de unión a antígeno dirigidas a CEA se usaron las siguientes líneas celulares tumorales: la línea celular de cáncer gástrico humano MKN45 (DSMZ n.º ACC 409), que expresaba niveles muy altos de CEA humano; la línea celular de adenocarcinoma de colon en mujer humana caucásica LS-174T (ECACC n.º 87060401), que expresaba niveles medios a bajos de CEA humano; la línea celular de carcinoma pancreático epitelioide humano Panc-1 (ATCC n.º CRL-1469), que expresaba niveles (muy) bajos de CEA humano; y una línea celular de carcinoma de colon murino MC38-huCEA, que se diseñó internamente para expresar de manera estable el CEA humano.

Además, se usó una línea celular de leucemia de linfocitos T humanos, Jurkat (ATCC n.º TIB-152), para evaluar la unión de diferentes construcciones biespecíficas a CD3 humano sobre las células.

Ejemplo 1

Preparación, purificación y caracterización de moléculas biespecíficas de unión a antígeno

Las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera se subclonaron en la estructura con la cadena pesada constante o la cadena ligera constante preinsertada en el vector de expresión de mamífero receptor respectivo. La expresión del anticuerpo estaba dirigida por un promotor MPSV y una secuencia señal poliA sintética localizada en el extremo 3' de CDS. Además, cada vector contenía una secuencia de OriP EBV.

Las moléculas se produjeron cotransfectando células HEK293 EBNA con los vectores de expresión de mamíferos. Se transfectaron células HEK293 EBNA de crecimiento exponencial usando el procedimiento del fosfato de calcio. Alternativamente, las células HEK293 EBNA que crecían en suspensión se transfectaron usando polietilenimina (PEI). Para la preparación de las construcciones «1+1 scFab IgG, con un brazo/un brazo invertido», las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:1:1 («cadena pesada de vector»: «cadena ligera de vector»: «cadena pesada de vector-scFab»). Para la preparación de las construcciones «2+1 IgG scFab», las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:2:1 («cadena pesada de vector»: «cadena ligera de vector»: «cadena pesada de vector-scFab»). Para la preparación de las construcciones «1+1 IgG Crossfab», las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:1:1:1 («primera cadena pesada de vector»: «primera cadena ligera de vector»: «cadena ligera de vector Crossfab»: «primera cadena pesada de vector-cadena pesada Crossfab»). Para la preparación de las construcciones «2+1 IgG Crossfab», las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:2:1:1 («primera cadena pesada de vector»: «cadena ligera de vector»: «primera cadena pesada de vector-cadena pesada de Crossfab»: «cadena ligera de vector Crossfab»). Para la preparación de la construcción «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada», las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:1:1:1 («cadena pesada de vector»: «cadena ligera de vector»: «cadena pesada de vector (CrossFab-Fab-Fc)»: «cadena ligera unida de vector»). Para la preparación de la construcción «1+1 CrossMab», las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:1:1:1 («primera cadena pesada de vector»: «segunda cadena pesada de vector»: «primera cadena ligera de vector»: «segunda cadena ligera de vector»). Para la preparación de la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión de cadena ligera», las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes en una proporción 1:1:1:1 («primera cadena pesada de vector»: «segunda cadena pesada de vector»: «cadena ligera de vector Crossfab»: «segunda cadena ligera de vector»).

Para la transfección usando fosfato de calcio, las células se cultivaron como cultivos monocapa adherentes en matraces en T usando medio de cultivo DMEM enriquecido con FCS al 10 % (v/v), y se transfectaron cuando tenían confluencia entre un 50 y un 80 %. Para la transfección de un matraz T150 se sembraron 15 millones de células 24 horas antes de la transfección en 25 ml de medio de cultivo DMEM enriquecido con FCS (al 10 % v/v final), y las células se colocaron a 37 °C en una incubadora con una de atmósfera de un 5 % de CO_2 durante la noche. Para cada matraz T150 que se iba a transfectar se preparó una solución de ADN, $CaCl_2$ y agua mezclando 94 g de ADN de vector plasmídico total divididos en la proporción correspondiente, agua a un volumen final de 469 µl y 469 µl de una solución 1 M de $CaCl_2$. A esta solución se añadieron 938 µl de una solución HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 s y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 s. La suspensión se diluyó con 10 ml de DMEM enriquecido con FCS al 2 % (v/v) y se añadió al T150 en lugar del medio existente. Posteriormente, se añadieron 13 ml adicionales de medio de transfección. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante aproximadamente 17 a 20 horas y, a continuación, se sustituyó el medio por 25 ml de DMEM, FCS al 10 %. El medio de cultivo acondicionado se extrajo aproximadamente 7 días después del intercambio de medios por centrifugación durante 15 min a 210 x g, se filtró de forma estéril (filtro de 0,22 µm), se enriqueció con azida de sodio a una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo a 4 °C.

Para la transfección usando polietilenimina (PEI), las células HEK293 EBNA se cultivaron en suspensión en medio de cultivo CD CHO libre de suero. Para la producción en matraces de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de PEI, la mezcla se sometió a agitación vorticial durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de un 5 % de CO_2. Después del tiempo de incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadió ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % (Lonza). Después de un cultivo de 7 días, se recogió el sobrenadante para la purificación por centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se filtró de forma estéril (filtro de 0,22 µm), se enriqueció con azida de sodio a una concentración final de 0,01 % p/v y se mantuvo a 4 °C. Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad con proteína A, seguido de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la cromatografía de afinidad, el sobrenadante se cargó en una columna HiTrap ProteinA HP (CV = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 25 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5 o con 40 ml de fosfato

de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos diez volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M a pH 7,5, seguido de una etapa de lavado adicional usando seis volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M a pH 5,45. Posteriormente, la columna se lavó con 20 ml de MES 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 5,0, y la proteína diana se eluyó en seis volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. De forma alternativa, la proteína diana se eluyó usando un gradiente sobre 20 volúmenes de columna desde citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5 hasta citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 2,5. La solución de proteína se neutralizó añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8. La proteína diana se concentró y se filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con una solución de fosfato de potasio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, glicina 100 mM a pH 6,7. Para la purificación de 1+1 IgG Crossfab, la columna se equilibró con una solución de histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM a pH 6,0.

La concentración de proteína de las muestras de proteína purificada se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y la masa molecular de las construcciones biespecíficas se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con Coomassie (SimpleBlue™ SafeStain de Invitrogen) usando el sistema de gel Pre-Cast NuPAGE® (Invitrogen, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (geles de Tris-acetato al 4-12 % o Bis-Tris al 4-12 %). De forma alternativa, la pureza y la masa molecular de las moléculas se analizaron mediante análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor, utilizando el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Lifescience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El contenido de agregado de las muestras de proteínas se analizó usando una columna de cromatografía analítica de exclusión por tamaño Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) en tampón de desarrollo MOPS 2 mM, NaCl 150 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 7,3 a 25 °C. De forma alternativa, contenido de agregado de las muestras de anticuerpo se analizó usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en tampón de desarrollo K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 a 25 °C.

Las Figuras 2-14 muestran los resultados de la SDS PAGE y de la cromatografía analítica de exclusión por tamaño y la Tabla 2A muestra los rendimientos, el contenido de agregado después de la proteína A y el contenido de monómero final de las preparaciones de las diferentes construcciones biespecíficas.

La Figura 47 muestra el resultado de los análisis CE-SDS de la construcción anti-CD3/anti-MCSP biespecífica «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29 y 179). Se usaron 2 µg de muestra para los análisis. La Figura 48 muestra el resultado de la cromatografía analítica de exclusión por tamaño del producto final (inyección de 20 µg de muestra).

La Figura 54 muestra los resultados de los análisis de CE-SDS y SDS PAGE de diversas construcciones, y la Tabla 2A muestra los rendimientos, el contenido de agregado después de la proteína A y el contenido de monómero final de las preparaciones de las diferentes construcciones biespecíficas.

TABLA 2A Rendimientos, contenido de agregado después de la proteína A y contenido final de monómero.

Construcción	**Rendimiento [mg/l]**	**Contenido de agregado después de la proteína A [%]**	**Alto PM [%]**	**Bajo PM [%]**	**Monómero [%]**
MCSP					
2+1 IgG Crossfab; intercambio VH/VL (LC007/V9) (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33)	12,8	2,2	0	0	100
2+1 IgG Crossfab; intercambio VH/VL (LC007/FN18) (SEQ ID NO: 3, 5, 35, 37)	3,2	5,7	0,4	0	99,6
2+1 IgG scFab, P329G LALA (SEQ ID NO: 5, 21, 23)	11,9	23	0,3	0	99,7
2+1 IgG scFab, LALA (SEQ ID NO: 5, 17, 19)	9	23	0	0	100
2+1 IgG scFab, P329G LALA N297D (SEQ ID NO: 5, 25, 27)	12,9	32,7	0	0	100
2+1 IgG scFab, wt (SEQ ID NO: 5, 13, 15)	15,5	31,8	0	0	100
1+1 IgG scFab (SEQ ID NO: 5, 21, 213)	7	24,5	0	0	100
1+1 IgG scFab «un brazo» (SEQ ID NO: 1, 3, 5)	7,6	43,7	2,3	0	97,7
1+1 IgG scFab «un brazo invertido» (SEQ ID NO: 7, 9, 11)	1	27	7,1	9,1	83,8

1+1 IgG Crossfab; intercambio VH/VL (LC007/V9) (SEQ ID NO: 5, 29, 31, 33)	9,8	0	0	0	100
2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada; intercambio VL/VH (LC007/V9) (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179)	0,54	40	1,4	0	98,6
1+1 IgG Crossfab; intercambio VL/VH (LC007/V9) (SEQ ID NO: 5, 29, 33, 181)	6,61	8,5	0	0	100
1+1 CrossMab; intercambio CL/CH1 (LC00/V9) (SEQ ID NO: 5, 23, 183, 185)	6,91	10,5	1,3	1,7	97
2+1 IgG Crossfab, invertido; intercambio CL/CH1 (LC007/V9) (SEQ ID NO: 5, 23, 183, 187)	9,45	6,1	0,8	0	99,2
2+1 IgG Crossfab; intercambio VL/VH (M4-3 ML2/V9) (SEQ ID NO: 33, 189, 191, 193)	36,6	0	9,5	35,3	55,2
2+1 IgG Crossfab; intercambio CL/CH1 (M4-3 ML2/V9) (SEQ ID NO: 183, 189, 193, 195)	2,62	12	2,8	0	97,2
2+1 IgG Crossfab; intercambio CL/CH1 (M4-3 ML2/H2C) (SEQ ID NO: 189, 193, 199, 201)	29,75	0	0	0	100
2+1 IgG Crossfab; intercambio CL/CH1 (LC007/anti-CD3) (SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217)	1,2	0	1,25	1,65	97,1
2+1 IgG Crossfab, invertido; intercambio CL/CH1 (LC007/anti-CD3) (SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219)	7,82	0,5	0	0	100
EGFR					
2+1 IgG scFab (SEQ ID NO: 45, 47, 53)	5,2	53	0	30	70
1+1 IgG scFab (SEQ ID NO: 47, 53, 213)	3,4	66,6	0	1,6	98,4
1+1 IgG scFab «un brazo» (SEQ ID NO: 43, 45, 47)	9,05	60,8	0	0	100
1+1 IgG scFab «un brazo invertido» (SEQ ID NO: 11, 49, 51)	3,87	58,8	0	0	100
FAP					
2+1 IgG scFab (SEQ ID NO: 57, 59, 61)	12,57	53	0	0	100
1+1 IgG scFab (SEQ ID NO: 57, 61, 213)	17,95	41	0,4	0	99,6
1+1 IgG scFab «un brazo invertido» (SEQ ID NO: 11, 51, 55)	2,44	69	0,6	0	99,4
CEA					
2+1 IgG Crossfab, invertido; intercambio VL/VH (CH1A1A/V9) (SEQ ID NO: 33, 63, 65, 67)	0,34	13	4,4	0	95,6
2+1 IgG Crossfab, invertido; intercambio CL/CH1 (CH1A1A/V9) (SEQ ID NO: 65, 67, 183, 197)	12,7	43	0	0	100
2+1 IgG Crossfab, invertido; intercambio CL/CH1 (431/26/V9) (SEQ ID NO: 183, 203, 205, 207)	7,1	20	0	0	100
1+1 IgG-Crossfab, fusión de cadena ligera (CH1A1A/V9) (SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213)	7,85	27	4,3	3,2	92,5

Como controles se generaron moléculas biespecíficas de unión a antígeno en el formato scFv en tándem de la técnica anterior («$(scFv)_2$») y fusionando un scFv en tándem a un dominio Fc («$(scFv)_2$-Fc»). Las moléculas se produjeron en células HEK293-EBNA y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A, seguida de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño de una manera análoga a la descrita anteriormente. Debido a la alta formación de agregados, algunas de las muestras tuvieron que purificarse adicionalmente aplicando muestras eluidas y concentradas desde la columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) a una columna Superdex 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,7 para obtener proteína con alto contenido de monómero. Posteriormente, la concentración de proteína, la pureza y la masa molecular, y el contenido de agregado se determinaron como se describe anteriormente.

Los rendimientos, el contenido de agregado después de la primera etapa de purificación y el contenido de monómero final para las moléculas de control se muestran en la Tabla 2B. La comparación del contenido de agregado después de la primera etapa de purificación (Proteína A) indica la mayor estabilidad de las construcciones IgG Crossfab e IgG scFab en comparación con moléculas «$(scFv)_2$-Fc» y con las moléculas «$(dsscFv)_2$-Fc» estabilizadas por puente

disulfuro.

TABLA 2B Rendimientos, contenido de agregado después de la proteína A y contenido final de monómero.

Construcción	**Rendimiento [mg/l]**	**Agregados después de proteína A [%]**	**Final**		
			Alto PM [%]	**Bajo PM [%]**	**Monómero [%]**
$(scFv)_2$-Fc (anti-MCSP/anti-huCD3)	76,5	40	0,5	0	99,5
$(dsscFv)_2$-Fc (anti-MCSP/anti-huCD3)	2,65	48	7,3	8,0	84,7

La estabilidad térmica de las proteínas se monitorizó mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Se aplicaron 30 µg de muestra de proteína filtrada con una concentración de proteína de 1 mg/ml por duplicado en un lector de placa Dynapro (Wyatt Technology Corporation, EE. UU.). La temperatura se aumentó de 25 a 75 °C a 0,05 °C/min, recogiéndose el radio y la intensidad de dispersión total. Los resultados se muestran en la Figura 15 y en la Tabla 2C. Para la molécula «$(scFv)_2$-Fc» (anti-MCSP/anti-huCD3) se observaron dos puntos de agregación, a 49 °C y a 68 °C. La construcción «$(dsscFv)_2$-Fc» tiene una temperatura de agregación mayor (57 °C) como resultado del puente disulfuro introducido (Figura 15A, Tabla 2C). Ambas construcciones, la «2+1 IgG scFab» y la «2+1 IgG Crossfab» se agregan a temperaturas superiores a 60 °C, lo que demuestra su superior estabilidad térmica en comparación con los formatos «$(scFv)_2$-Fc» y «$(dsscFv)_2$-Fc» (Figura 15B, Tabla 2C).

TABLA 2C. Estabilidad térmica determinada por dispersión de luz dinámica.

Construcción	**T_{ag} [°C]**
2+1 IgG scFab (LC007/V9)	68
2+1 IgG Crossfab (LC007/V9)	65
Fc-$(scFv)_2$ (LC007/V9)	49/68
Fc-$(dsscFv)_2$ (LC007/V9)	57

Ejemplo 2

Análisis por resonancia de plasmón superficial de la unión al receptor Fc y al antígeno diana

Procedimiento

Todos los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron en un Biacore T100 a 25 °C con HBS-EP como tampón de desarrollo (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Freiburg/Alemania).

Análisis de la unión a FcR de diferentes variantes de Fc

La configuración del ensayo se muestra en la Figura 16A. Para analizar la interacción de diferentes variantes de Fc con FcγRIIIa-V158 humano y FcγRIV murino, se realiza un acoplamiento directo de alrededor de 6500 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Freiburg/Alemania). HuFcγRIIIa-V158-K6H6 y muFcγRIV-aviHis-biotina se capturan durante 60 s a 4 y 10 nM, respectivamente.

Las construcciones con diferentes mutaciones Fc se pasan a través de las cubetas de lectura durante 120 s a una concentración de 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. La disociación se monitoriza durante 220 s. Las diferencias en el índice de refracción masivo se corrigen restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia. En el presente documento, las variantes de Fc se hacen volar sobre una superficie con anticuerpo anti-Penta His inmovilizado, pero en la que se ha inyectado HBS-EP en lugar de HuFcγRIIIa-V158-K6H6 o muFcγRIV-aviHis-biotina. La afinidad por FcγRIIIa-V158 humano y FcγRIV murino se determinó para Fc natural usando un intervalo de concentración de 500-4000 nM.

La respuesta en estado estacionario se usó para derivar la constante de disociación K_D mediante ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Las constantes cinéticas se obtuvieron utilizando el programa informático de evaluación Biacore T100 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia) para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica.

Resultados

La interacción de las variantes de Fc con FcγRIIIa humano y FcγRIV murino se monitorizó mediante resonancia de plasmón superficial. La unión a huFcγRIIIa-V158-K6H6 y muFcγRIV-aviHis-biotina capturadas se reduce

significativamente para todos los mutantes Fc analizados en comparación con la construcción con un dominio Fc natural (wt).

Los mutantes Fc con la unión más baja al receptor Fcγ humano fueron P329G L234A L235A (LALA) y P329G LALA N297D. La mutación LALA sola no fue suficiente para anular la unión a huFcγRIIIa-V158-K6H6. La variante Fc que portaba solo la mutación LALA tenía una afinidad de unión residual por FcγRIIIa humana de 2,100 nM, mientras que el dominio Fc natural se unía al receptor FcγRIIIa humano con una afinidad de 600 nM (Tabla 3). Ambos valores de K_D se obtuvieron a partir del modelo de unión 1:1, usando una única concentración.

La afinidad por FcγRIIIa-V158 humano y FcγRIV murino solo se pudo analizar para el dominio Fc natural. Los valores de K_D se enumeran en la Tabla 3. La unión al FcγRIV murino se eliminó casi por completo para todos los mutantes Fc analizados.

TABLA 3. Afinidad de variantes de Fc por FcγRIIIa-V158 humano y FcγRIV murino.

K_D en nM T = 25 °C	**FcγRIIIa-V158 humano**		**FcγRIV murino**	
	estado cinético	**estado estacionario**	**estado cinético**	**estado estacionario**
Fc-wt (SEQ ID NO: 5, 13, 15)	600* (1200)	3470	576	1500
Fc-LALA (SEQ ID NO: 5, 17, 19)	2130*	n.d.	n.d.	
Fc-P329G LALA (SEQ ID NO: 5, 21, 23)	n.d.		n.d.	
Fc-P329G LALA N297D (SEQ ID NO: 5, 25, 27)	n.d.		n.d.	

* determinado usando una concentración (1000 nM)

Análisis de unión simultánea al antígeno tumoral y al CD3

Análisis de la unión simultánea de las construcciones biespecíficas activadoras de linfocitos T al antígeno tumoral y al CD3 humano se realizó por acoplamiento directo de 1650 unidades de resonancia (UR) del dominio D3 biotinilado de MCSP en un chip detector SA usando el procedimiento de acoplamiento estándar. El EGFR humano se inmovilizó usando un procedimiento de acoplamiento amino estándar. Se inmovilizaron 8000 UR en un chip detector CM5 a pH 5,5. La configuración del ensayo se muestra en la Figura 16B.

Se capturaron diferentes construcciones biespecíficas activadoras de linfocitos T durante 60 s a 200 nM. El CD3γ$(G_4S)_5$CD3ε–AcTev–Fc(botón)–Avi/Fc(ojal) humano se pasó posteriormente a una concentración de 2000 nM y un caudal de 40 µl/min durante 60 s. Las diferencias en el índice de refracción masivo se corrigieron restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia en la que el CD3 recombinante se hizo volar sobre una superficie con dominio D3 inmovilizado de MCSP o EGFR sin las construcciones biespecíficas activadoras de linfocitos T capturadas.

Resultados

La unión simultánea al antígeno tumoral y al CD3 humano se analizó mediante resonancia de plasmón superficial (Figura 17, Figura 18). Todas las construcciones fueron capaces de unirse al antígeno tumoral y al CD3 simultáneamente. Para la mayoría de las construcciones, el nivel de unión (UR) después de la inyección de CD3 humano fue mayor que el nivel de unión logrado después de la inyección de la construcción sola, lo que refleja que tanto el antígeno tumoral como el CD3 humano estaban unidos a la construcción.

Ejemplo 3

Unión de construcciones biespecíficas al antígeno diana respectivo en las células

La unión de las diferentes construcciones biespecíficas al CD3 en células Jurkat (ATCC n.º TIB-152) y al respectivo antígeno tumoral en células diana se determinó mediante FACS. En resumen, las células se extrajeron, se contaron y se verificó su viabilidad. Se sembraron en placa 0,15-0,2 millones de células por pocillo (en PBS que contenía BSA al 0,1 %, 90 µl) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con la concentración indicada de las construcciones biespecíficas y los correspondientes controles de IgG (10 µl) durante 30 min a 4 °C. Para una mejor comparación, todas las construcciones y controles de IgG se normalizaron a la misma molaridad. Después de la incubación, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 150 µl de PBS que contenía BSA al 0,1 %, se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4 °C con 12 µl/pocillo de un anticuerpo secundario conjugado con FITC o PE. Las construcciones unidas se detectaron usando un FACSCantoII (Software FACS Diva).

La molécula «$(scFv)_2$» se detectó utilizando un anticuerpo anti-His conjugado con FITC (Lucerna, n.º RHIS-45F-Z). Para todas las demás moléculas se usó un fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure de cabra conjugado con anti-FITC o PE humano, específico para fragmento Fcγ (Jackson Immuno Research Lab n.º 109-096-098 / solución de trabajo 1:20, o n.º 109-116-170 / solución de trabajo 1:80, respectivamente). Las células se lavaron mediante la adición de 120 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y centrifugación a 350 x g durante 5 min. Se realizó una segunda etapa de lavado con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 %. A menos que se indique lo contrario, las células se fijaron con 100 µl/pocillo de tampón de fijación (BD n.º 554655) durante 15 min a 4 °C en oscuridad, se centrifugaron durante 6 min a 400 x g y se guardaron en 200 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % hasta que las muestras se midieron con FACS CantoII. Los valores de CE_{50} se calcularon usando el programa informático GraphPad Prism. En un primer experimento, se analizaron diferentes construcciones biespecíficas dirigidas a MCSP humano y CD3 humano mediante citometría de flujo para determinar la unión a CD3 humano expresada en linfocitos T de leucemia humana Jurkat, o a MCSP humano en células de melanoma humano Colo-38.

Los resultados se presentan en las Figuras 19-21 y muestran la intensidad media de fluorescencia de las células que se incubaron con la molécula biespecífica, la IgG de control, el anticuerpo secundario solamente o las que no se trataron.

Como se muestra en la Figura 19, para ambos restos de unión a antígeno de la molécula «$(scFv)_2$», es decir, CD3 (Figura 19A) y MCSP (Figura 19B), se observa una señal de unión clara en comparación con las muestras de control.

La molécula «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 5, 17, 19) muestra una buena unión a huMCSP en células Colo-38 (Figura 20A). El resto CD3 se une a CD3 ligeramente mejor que la IgG anti-CD3 humano de referencia (Figura 20B).

Como se representa en la Figura 21A, las dos construcciones «1+1» muestran señales de unión comparables a CD3 humano en las células. La IgG anti-CD3 humano de referencia proporciona una señal ligeramente más débil. Además, ambas construcciones evaluadas («1+1 IgG scFab, con un brazo» (SEQ ID NO: 1, 3, 5) y «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (SEQ ID NO: 7, 9, 11)) muestran una unión comparable a MCSP humano en las células (Figura 21B). La señal de unión obtenida con la referencia IgG anti-MCSP humano es ligeramente más débil.

En otro experimento, la construcción biespecífica «2+1 IgG scFab» purificada (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la IgG anti-MCSP humano correspondiente se analizaron por citometría de flujo para la unión dependiente de la dosis a MCSP humano en células de melanoma humano Colo-38, para determinar si la construcción biespecífica se une a MCSP a través de uno o ambos de sus «brazos». Como se representa en la Figura 22, la construcción «2+1 IgG scFab» muestra el mismo patrón de unión que el IgG MCSP.

En otro experimento más se evaluó la unión a CD3 humano de las construcciones biespecíficas para CD3/CEA «2+1 IgG Crossfab, invertida» con intercambio VL/VH (véase SEQ ID NO: 33, 63, 65, 67) o CL/CH1 (véase SEQ ID NO: 66, 67, 183, 197) en el fragmento Crossfab, expresado por células Jurkat, o a CEA humano, expresado por células LS-174T. Como control también se evaluaron la concentración máxima equivalente de las IgG correspondientes y la tinción de fondo debida al anticuerpo secundario marcado (fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure de cabra conjugado con anti-FITC humano, específico para fragmento Fcγ, Jackson Immuno Research Lab n.º 109-096-098). Como se ilustra en la Figura 55, ambas construcciones muestran una buena unión al CEA humano, así como al CD3 humano en las células. Los valores de CE_{50} calculados fueron de 4,6 y 3,9 nM (CD3) y de 9,3 y 6,7 nM (CEA) para las construcciones «2+1 IgG Crossfab, invertido (VL/VH)» y «2+1 IgG Crossfab, invertido (CL/CH1)», respectivamente.

En otro experimento se evaluó la unión de las construcciones para CD3/MCSP «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «2+1 IgG Crossfab, invertido» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 187) a CD3 humano, expresadas por células Jurkat, o a MCSP humano, expresadas por células WM266-4. La Figura 56 muestra que, aunque la unión de ambas construcciones a MCSP en células era comparablemente buena, la unión de la construcción «invertida» a CD3 se redujo en comparación con la otra construcción. Los valores de CE_{50} calculados fueron de 6,1 y 1,66 nM (CD3) y de 0,57 y 0,95 nM (MCSP) para las construcciones «2+1 IgG Crossfab, invertido» y «2+1 IgG Crossfab», respectivamente.

En un experimento adicional se determinó la unión de la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión de cadena ligera (LC)» (SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213) a CD3 humano, expresada por células Jurkat, y a CEA humano, expresada por células LS-174T. Como control también se evaluaron la concentración máxima equivalente de las IgG anti-CD3 y anti-CEA correspondientes y la tinción de fondo debida al anticuerpo secundario marcado (fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure de cabra conjugado con anti-FITC humano, específico para fragmento Fcγ, Jackson Immuno Research Lab n.º 109-096-098). Como se representa en la Figura 57, la unión de la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión LC» a CEA parece reducirse en gran medida, mientras que la unión a CD3 fue al menos comparable a la de la IgG de referencia.

En un experimento final se determinó la unión de las construcciones «2+1 IgG Crossfab» (SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217) y la «2+1 IgG Crossfab, invertida» (SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219) a CD3 humano, expresadas por células Jurkat, y a MCSP humano, expresadas por células tumorales WM266-4. Como se representa en la Figura 58, la unión a CD3 humano se redujo para la construcción «2+1 IgG Crossfab, invertida» en comparación con la otra construcción, pero la unión a MCSP humano fue comparablemente buena. Los valores de CE_{50} calculados fueron de 10,3 y 32,0 nM

(CD3) y de 3,1 y 3,4 nM (MCSP) para las construcciones «2+1 IgG Crossfab» y «2+1 IgG Crossfab, invertida», respectivamente.

Ejemplo 4

Análisis FACS de marcadores de activación de superficie en linfocitos T humanos primarios tras el acoplamiento de construcciones biespecíficas

Las moléculas «$(scFv)_2$» y «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 5, 17, 19) biespecífica dirigida a huMCSP-huCD3 se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su potencial para regular por incremento el marcador de activación de superficie temprana CD69, o el marcador de activación tardía CD25 en linfocitos T $CD8^+$ en presencia de células tumorales que expresan MCSP humano.

En resumen, las células Colo-38 positivas para MCSP se recogieron con tampón de disociación celular, se contaron y se comprobó su viabilidad. Las células se ajustaron a 0,3 x 10^6 células (viables) por ml en medio AIM-V y se pipetearon 100 µl de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (como se indica). Se añadieron 50 µl de la construcción biespecífica (diluida) a los pocillos que contenían células para obtener una concentración final de 1 nM. Se aislaron células efectoras PBMC humanas a partir de sangre fresca de un donante sano y se ajustaron a 6 x 10^6 células (viables) por ml en medio AIM-V. Se añadieron 50 µl de esta suspensión celular por pocillo de la placa de ensayo (véase más arriba) para obtener una proporción E:T final de 10:1. Para analizar si las construcciones biespecíficas son capaces de activar linfocitos T exclusivamente en presencia de células diana que expresan el antígeno tumoral huMCSP, se incluyeron pocillos que contenían 1 nM de las moléculas biespecíficas respectivas, así como PBMC, pero no células diana. Después de la incubación durante 15 h (CD69) o 24 h (CD25) a 37 °C, 5 % de CO_2, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g) y se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contiene BSA al 0,1 %. La tinción superficial para CD8 (IgG1,κ de ratón, clon HIT8a, BD n.º 555635), CD69 (IgG1 de ratón, clon L78, BD n.º 340560) y CD25 (IgG1,κ de ratón; clon M-A251; BD n.º 555434) se realizó a 4 °C durante 30 min de acuerdo con las sugerencias del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron durante 15 min a 4 °C, usando 100 µl/pocillo de tampón de fijación (BD n.º 554655). Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron usando un equipo FACS CantoII (Software FACS Diva).

La Figura 23 representa el nivel de expresión del marcador de activación temprana CD69 (A), o el marcador de activación tardía CD25 (B) en linfocitos T $CD8^+$ después de 15 horas o 24 horas de incubación, respectivamente. Ambas construcciones inducen la regulación por incremento de ambos marcadores de activación exclusivamente en presencia de células diana. La molécula «$(scFv)_2$» parece ser ligeramente más activa en este ensayo que la construcción «2+1 IgG scFab».

La molécula «$(scFv)_2$» y «2+1 scG scFab» biespecífica dirigida a huMCSP-huCD3 purificada se analizaron adicionalmente mediante citometría de flujo para determinar su potencial para regular por incremento el marcador de activación tardía CD25 en linfocitos T $CD8^+$ o linfocitos T $CD4^+$ en presencia de células tumorales que expresan MCSP humano. Los procedimientos experimentales fueron como se describe anteriormente, usando células efectoras pan T humanas en una proporción E:T de 5:1 y un tiempo de incubación de cinco días.

La Figura 24 muestra que ambas construcciones inducen la regulación por incremento de CD25 exclusivamente en presencia de células diana tanto en linfocitos T $CD8^+$ (A) como $CD4^+$ (B). La construcción «2+1 IgG scFab» parece inducir una menor regulación por incremento de CD25 en este ensayo, en comparación con la molécula «$(scFv)_2$». En general, la regulación por incremento de CD25 es más pronunciada en linfocitos T $CD8^+$ que en linfocitos T $CD4^+$.

En otro experimento se analizó «2+1 IgG Crossfab» purificada dirigida a CD3 de macaco y MCSP humano (SEQ ID NO: 3, 5, 35, 37) para determinar su potencial para regular por incremento el marcador de activación superficial CD25 en linfocitos T $CD8^+$ en presencia de células diana tumorales. En resumen, las células diana tumorales MV-3 que expresan MCSP humano se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron y resuspendieron en DMEM que contenía FCS al 2 % y GlutaMax al 1 %. Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadió la correspondiente dilución de anticuerpo a las concentraciones indicadas (Figura 25). La construcción biespecífica y los diferentes controles de IgG se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células efectoras PBMC de macaco, aisladas de sangre de dos animales sanos, para obtener una proporción E:T final de 3:1. Después de una incubación durante 43 h a 37 °C, 5 % de CO_2, las células se centrifugaron a 350 x g durante 5 min y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1 %. La tinción superficial para CD8 (Miltenyi Biotech n.º 130-080-601) y CD25 (BD n.º 557138) se realizó de acuerdo con las sugerencias del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron durante 15 min a 4 °C, usando 100 µl/pocillo de tampón de fijación (BD n.º 554655). Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron usando un equipo FACS CantoII (Software FACS Diva).

Como se representa en la Figura 25, la construcción biespecífica induce una regulación por incremento dependiente de la concentración de CD25 en linfocitos T $CD8^+$ solo en presencia de células diana. El IgG anti-CD3 de macaco (clon FN-18) también puede inducir la regulación por incremento de CD25 en linfocitos T $CD8^+$, sin estar entrelazado (véase

datos obtenidos con macaco Nestor). No hay hiperactivación de los linfocitos T de macaco con la concentración máxima de la construcción biespecífica (en ausencia de células diana).

En otro experimento se comparó el «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada» para CD3-MCSP (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179) con el «2+1 IgG Crossfab» para CD3-MCSP (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) para determinar su potencial para regular por incremento el marcador de activación temprana CD69 o el marcador de activación tardía CD25 en linfocitos T $CD8^+$ en presencia de células diana tumorales. Las PBMC humanas primarias (aisladas como se describe anteriormente) se incubaron con las concentraciones indicadas de construcciones biespecíficas durante al menos 22 h en presencia o ausencia de células diana Colo-38 positivas para MCSP. En resumen, se sembraron 0,3 millones de PBMC humanas primarias por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano, que contenía las células diana positivas para MCSP (o medio). La proporción final entre células efectoras y diana (E:T) fue de 10:1. Las células se incubaron con la concentración indicada de las construcciones biespecíficas y durante los tiempos de incubación indicados a 37 °C, 5 % de CO_2. Las células efectoras se tiñeron para CD8 y CD69 o CD25 y se analizaron mediante un equipo FACS CantoII.

La Figura 53 muestra el resultado de este experimento. No se detectaron diferencias significativas para la regulación por incremento de CD69 (A) o CD25 (B) entre las dos moléculas 2+1 IgG Crossfab (con o sin la cadena ligera conectada).

En otro experimento más, las construcciones «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «1+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 29, 33, 181) para CD3/MCSP se compararon con la construcción «1+1 CrossMab» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 185) para determinar su potencial para regular por incremento CD69 o CD25 en linfocitos T $CD4^+$ o $CD8^+$ en presencia de células diana tumorales. El ensayo se realizó como se describe anteriormente, en presencia o ausencia de células tumorales MV-3 que expresan MCSP humano, con un tiempo de incubación de 24 h.

Como se muestra en la Figura 59, las construcciones «1+1 IgG Crossfab» y «2+1 IgG Cross Fab» indujeron una regulación por incremento más pronunciada de los marcadores de activación que la molécula «1+1 CrossMab».

En un experimento final, las construcciones «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217) y «2+1 IgG Crossfab, invertido» (véase SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219) para CD3/MCSP se evaluaron para determinar su potencial para regular por incremento CD25 en linfocitos T $CD4^+$ o $CD8^+$ de macacos diferentes en presencia de células diana tumorales. El ensayo se realizó como se describe anteriormente, en presencia de células tumorales MV-3 que expresan MCSP humano, con una proporción E:T de 3:1 y un tiempo de incubación de aproximadamente 41 h.

Como se muestra en la Figura 60, ambas construcciones fueron capaces de regular por incremento CD25 en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ de una manera dependiente de la concentración, sin diferencia significativa entre los dos formatos. Las muestras de control sin anticuerpo y sin células diana dieron una señal comparable a las muestras con anticuerpo, pero sin dianas (no se muestra).

Ejemplo 5

Secreción de interferón-γ tras la activación de linfocitos pan T humanos con construcciones biespecíficas para CD3

Se analizó la construcción «2+1 IgG scFab» dirigida a MCSP humano y a CD3 humano (SEQ ID NO: 5, 17, 19) para determinar su potencial para inducir la activación de linfocitos T en presencia de células U-87MG positivas para MCSP humano, medida por la liberación de interferón humano (IFN)-γ en el sobrenadante. Como controles se usaron IgG anti-MCSP humano y anti-CD3 humano, ajustadas a la misma molaridad. En resumen, las células diana de astrocitoma de glioblastoma U-87MG que expresan huMCSP (ECACC n.º 89081402) se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen n.º 12055-091). Se sembraron 20 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadió la dilución de anticuerpo respectiva para obtener una concentración final de 1 nM. Se añadieron células efectoras pan T humanas, aisladas de capas leucocíticas, para obtener una proporción E:T final de 5:1. Después de una incubación durante la noche de 18,5 h a 37 °C, 5 % de CO_2, la placa de ensayo se centrifugó durante 5 min a 350 x g y el sobrenadante se transfirió a un placa de 96 pocillos fresca. Los niveles de IFN-γ humano en el sobrenadante se midieron mediante ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD OptEIA human IFN-γ ELISA Kit II de Becton Dickinson, n.º 550612).

Como se representa en la Figura 26, las IgG de referencia muestran una inducción nula a débil de la secreción de IFN-γ, mientras que la construcción «2+1 IgG scFab» es capaz de activar linfocitos T humanos para secretar IFN-γ.

Ejemplo 6

Citotoxicidad de linfocitos T redirigida mediada por construcciones biespecíficas entrelazadas dirigidas a CD3 en linfocitos T y dirigidas a MCSP o EGFR en células tumorales (ensayo de liberación de LDH)

En una primera serie de experimentos, las construcciones biespecíficas dirigidas a CD3 y MCSP se analizaron para determinar su potencial para inducir apoptosis mediada por linfocitos T en células diana tumorales tras el entrelazamiento de la construcción a través de la unión de los restos de unión a antígeno a sus respectivos antígenos diana en células (Figuras 27-38).

En un experimento se compararon las construcciones «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 5, 21, 23) y «2+1 IgG Crossfab» (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) purificadas dirigidas a CD3 humano y a MCSP humano, y la molécula «$(scFv)_2$» correspondiente. En resumen, las células diana de melanoma humano MDA-MB-435 que expresan huMCSP se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen n.º 12055-091). Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadió la dilución respectiva de la construcción a la concentración indicada. Todas las construcciones y las IgG de control correspondientes se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células efectoras pan T humanas para obtener una proporción E:T final de 5:1. Como control positivo para la activación de los linfocitos pan T humanos se usó 1 µg/ml de PHA-M (Sigma n.º L8902, mezcla de isolectinas aisladas de *Phaseolus vulgaris*). Para la normalización, la lisis máxima de las células diana (= 100 %) se determinó mediante incubación de las células diana con una concentración final de un 1 % de Triton X-100. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana coincubadas con células efectoras, pero sin ninguna construcción o anticuerpo. Después de una incubación durante la noche de 20 h a 37 °C, 5 % de CO_2, la liberación de LDH de células diana apoptóticas/necróticas en el sobrenadante se midió con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se representa en la Figura 27, ambas construcciones «2+1» inducen apoptosis en células diana de manera comparable a la molécula «$(scFv)_2$».

Además, se compararon las construcciones «2+1 IgG Crossfab» (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) e «2+1 IgG scFab» purificadas que difieren en su dominio Fc, así como la molécula «$(scFv)_2$». Las diferentes mutaciones en el dominio Fc (L234A+L235A (LALA), P329G y/o N297D, como se indica) reducen o anulan la función de las células efectoras (NK) inducida por construcciones que contienen un dominio Fc natural (wt). Los procedimientos experimentales fueron como se describe anteriormente.

La Figura 28 muestra que todas las construcciones inducen apoptosis en células diana de manera comparable a la molécula «$(scFv)_2$».

La Figura 29 muestra el resultado de comparar la construcción «2+1 IgG scFab» purificada (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la molécula «$(scFv)_2$» para determinar su potencial para inducir apoptosis mediada por linfocitos T en células diana tumorales. Los procedimientos experimentales fueron como se describe anteriormente, utilizando células diana de melanoma humano Colo-38 que expresan huMCSP en una proporción E:T de 5:1, y una incubación durante la noche de 18,5 h. Como se representa en la figura, la construcción «2+1 IgG scFab» muestra actividad citotóxica comparable a la molécula «$(scFv)_2$».

De manera similar, la Figura 30 muestra el resultado de comparar la construcción «2+1 IgG scFab» purificada (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la molécula «$(scFv)_2$» utilizando células diana de melanoma humano Colo-38 que expresan huMCSP en una proporción E:T de 5:1 y un tiempo de incubación de 18 h. Como se representa en la figura, la construcción «2+1 IgG scFab» muestra actividad citotóxica comparable a la molécula «$(scFv)_2$».

La Figura 31 muestra el resultado de comparar la construcción «2+1 IgG scFab» purificada (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la molécula «$(scFv)_2$» utilizando células diana de melanoma humano MDA-MB-435 que expresan huMCSP en una proporción E:T de 5:1 y una incubación durante la noche de 23,5 h. Como se representa en la figura, la construcción induce apoptosis en células diana de forma comparable a la molécula «$(scFv)_2$». La construcción «2+1 IgG scFab» muestra una eficacia reducida a las concentraciones más altas.

Además, se analizaron diferentes construcciones biespecíficas que son monovalentes para ambas dianas, CD3 humano y MCSP humano, así como la correspondiente molécula «$(scFv)_2$» para determinar su potencial para inducir apoptosis mediada por linfocitos T. La Figura 32 muestra los resultados para las construcciones «1+1 IgG scFab, con un brazo» (SEQ ID NO: 1, 3, 5) y «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (SEQ ID NO: 7, 9, 11) usando células diana de melanoma humano Colo-38 que expresan huMCSP en una proporción E:T de 5:1, y un tiempo de incubación de 19 h. Como se muestra en la figura, ambas construcciones «1+1» son menos activas que la molécula «$(scFv)_2$», con la molécula «1+1 IgG scFab, un solo brazo» siendo superior a la molécula «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» en este ensayo.

La Figura 33 muestra los resultados para la construcción «1+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 5, 21, 213) usando células diana de melanoma humano Colo-38 que expresan huMCSP en una proporción E:T de 5:1 y un tiempo de incubación de 20 h. Como se representa en la figura, la construcción «1+1 IgG scFab» es menos citotóxica que la molécula «$(scFv)_2$».

En otro experimento, la construcción «2+1 IgG Crossfab» purificada (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33), la construcción «1+1 IgG Crossfab» (SEQ ID NO: 5, 29, 31, 33) y la molécula «$(scFv)_2$» se analizaron para determinar su potencial para

inducir apoptosis mediada por linfocitos T en células diana tumorales tras el entrelazamiento de la construcción a través de la unión de ambos antígenos diana, CD3 y MCSP en las células. Las células de melanoma humano MDA-MB-435 que expresan huMCSP se usaron como células diana, la proporción E:T fue 5:1 y el tiempo de incubación fue de 20 h. Los resultados se muestran en la Figura 34. La construcción «2+1 IgG Crossfab» induce apoptosis en células diana de forma comparable a la molécula «$(scFv)_2$». La comparación de los formatos mono y bivalente «IgG Crossfab» muestra claramente que el bivalente es mucho más potente.

En otro experimento más se analizó la construcción purificada «2+1 IgG Crossfab» (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) para determinar su potencial para inducir apoptosis mediada por linfocitos T en diferentes células diana (tumorales). En resumen, células diana tumorales Colo-38 positivas para MCSP, células madre mesenquimales (derivadas de médula ósea, Lonza n.º PT-2501 o tejido adiposo, Invitrogen n.º R7788-115) o pericitos (de placenta; PromoCell n.º C-12980), como se indica, se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron y se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen n.º 12055-091). Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadió la correspondiente dilución de anticuerpo a las concentraciones indicadas. Se añadieron células efectoras PBMC humanas aisladas de sangre fresca de un donante sano para obtener una proporción E:T final de 25:1. Después de una incubación durante 4 h a 37°C, 5 % de CO_2, la liberación de LDH de células diana apoptóticas/necróticas en el sobrenadante se midió con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se representa en la Figura 35, se pudo observar una significativa citotoxicidad mediada por linfocitos T solo con células Colo-38. Este resultado está en línea con los significativos niveles de expresión de MCSP de las células Colo-38, mientras que las células madre mesenquimales y los pericitos expresan MCSP solo muy débilmente.

La construcción purificada «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la molécula «$(scFv)_2$» también se compararon con un anticuerpo IgG anti-MCSP humano modificado por glucoingeniería, que tiene una proporción reducida de polisacáridos N fucosilados en su dominio Fc (MCSP GlycoMab). Para este experimento se usaron células diana de melanoma humano Colo-38 que expresan huMCSP y células efectoras PBMC humanas, ya sea a una proporción E:T fija de 25:1 (Figura 36A), o a diferentes relaciones E:T de 20:1 a 1:10 (Figura 36B). Las diferentes moléculas se usaron a las concentraciones indicadas en la Figura 36A, o a una concentración fija de 1667 pM (Figura 36B). La lectura se realizó después de 21 h de incubación. Como se representa en la Figura 36 A y B, ambas construcciones biespecíficas muestran una potencia mayor que MSCP GlycoMab.

En otro experimento se analizó la construcción «2+1 IgG Crossfab» dirigidas a CD3 de macaco y MCSP humano (SEQ ID NO: 3, 5, 35, 37). En resumen, las células diana tumorales MV-3 que expresan MCSP humano se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron y resuspendieron en DMEM que contenía FCS al 2 % y GlutaMax al 1 %. Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadió la dilución respectiva de la construcción o de la IgG de referencia a las concentraciones indicadas. La construcción biespecífica y los diferentes controles de IgG se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células efectoras PBMC de macaco, aisladas de sangre de macacos sanos, para obtener una proporción E:T final de 3:1. Después de la incubación durante 24 horas o 43 horas a 37 °C, 5 % de CO_2, se midió la liberación de LDH de las células diana apoptóticas/necróticas en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se representa en la Figura 37, la construcción biespecífica induce la liberación de LDH dependiente de la concentración de las células diana. El efecto es más fuerte después de 43 h que después de 24 h. La IgG anti-CD3 de macaco (clon FN-18) también es capaz de inducir la liberación de LDH de las células diana sin estar entrelazada.

La Figura 38 muestra el resultado de comparar la construcción purificada «2+1 IgG Crossfab» (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y la molécula «$(scFv)_2$» usando una línea celular de melanoma humano que expresa MCSP (MV-3) como células diana y PBMC humanas como células efectoras con una proporción E:T de 10:1 y un tiempo de incubación de 26 h. Como se representa en la figura, la construcción «2+1 IgG Crossfab» es más potente en términos de CE_{50} que la molécula «$(scFv)_2$».

En una segunda serie de experimentos, las construcciones biespecíficas dirigidas a CD3 y EGFR se analizaron para determinar su potencial para inducir apoptosis mediada por linfocitos T en células diana tumorales tras el entrelazamiento de la construcción a través de la unión de los restos de unión a antígeno a sus respectivos antígenos diana en células (Figuras 39-41).

En un experimento se compararon las construcciones «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 45, 47, 53) y «1+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 47, 53, 213) purificadas dirigidas a CD3 y EGFR, y la molécula «$(scFv)_2$» correspondiente. En resumen, las células diana tumorales LS-174T que expresan EGFR humano se recogieron con tripsina, se lavaron y se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen n.º 12055-091). Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadió la correspondiente dilución de anticuerpo a las concentraciones indicadas. Todas las construcciones y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células efectoras pan T humanas para obtener una proporción E:T final de 5:1. Como control positivo para la activación de los linfocitos pan T humanos se usó 1 µg/ml de PHA-M (Sigma n.º L8902). Para la normalización, la lisis máxima de las células diana

(= 100 %) se determinó mediante incubación de las células diana con una concentración final de un 1 % de Triton X-100. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana coincubadas con células efectoras, pero sin ninguna construcción o anticuerpo. Después de una incubación durante la noche de 18 h a 37 °C, 5 % de CO_2, la liberación de LDH de células diana apoptóticas/necróticas en el sobrenadante se midió con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se representa en la Figura 39, la construcción «2+1 IgG scFab» muestra actividad citotóxica comparable a la molécula «$(scFv)_2$», mientras que la construcción «1+1 IgG scFab» es menos activa.

En otro experimento se comparan las construcciones purificadas «1+1 IgG scFab, con un brazo» (SEQ ID NO: 43, 45, 47), «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (SEQ ID NO: 11, 49, 51) y «1+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 47, 53, 213) y la molécula «$(scFv)_2$». Las condiciones experimentales fueron como se describe anteriormente, excepto por el tiempo de incubación, que fue de 21 h.

Como se representa en la Figura 40, la construcción «1+1 IgG scFab» muestra una actividad citotóxica ligeramente menor que la molécula «$(scFv)_2$» en este ensayo. Ambas construcciones «1+1 IgG scFab, con un brazo (invertido)» son claramente menos activas que la molécula «$(scFv)_2$».

En otro experimento adicional se compararon las construcciones «1+1 IgG scFab, con un brazo» (SEQ ID NO: 43, 45, 47) y «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (SEQ ID NO: 11, 49, 51) y la molécula «$(scFv)_2$». El tiempo de incubación en este experimento fue de 16 h y el resultado se representa en la Figura 41. Incubados con linfocitos pan T humanos, ambas construcciones «1+1 IgG scFab, con un brazo (invertido)» son menos activas que la molécula «$(scFv)_2$», pero muestran liberación de LDH dependiente de la concentración de las células diana (Figura 41A). Tras el cocultivo de las células tumorales LS-174T con linfocitos T indiferenciados aislados de PBMC, las construcciones tenían solo una actividad basal, siendo la más activa la molécula «$(scFv)_2$» (Figura 41B).

En un experimento adicional se analizaron las construcciones purificadas «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» (SEQ ID NO: 11, 51, 55), «1+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 57, 61, 213) y «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 57, 59, 61) dirigidas a CD3 y a la proteína de activación de fibroblastos (FAP), y la molécula «$(scFv)_2$» correspondiente para determinar su potencial para inducir apoptosis mediada por linfocitos T en fibroblastos humanos que expresan FAP GM05389 tras el entrelazamiento de la construcción a través de la unión de ambos restos diana a sus respectivos antígenos diana en las células. En resumen, las células diana GM05389 humanas se recogieron con tripsina el día anterior, se lavaron y se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen n.º 12055-091). Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO_2 para permitir la recuperación y adhesión de las células. Al día siguiente, las células se centrifugaron, el sobrenadante se descartó y se añadió medio nuevo, así como la dilución respectiva de las construcciones o de las IgG de referencia a las concentraciones indicadas. Todas las construcciones y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células efectoras pan T humanas para obtener una proporción E:T final de 5:1. Como control positivo para la activación de los linfocitos pan T humanos se usó 5 µg/ml de PHA-M (Sigma n.º L8902). Para la normalización se determinó la lisis máxima de las células diana (= 100 %) mediante la incubación de las células diana a una concentración final de Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana coincubadas con células efectoras, pero sin ninguna construcción o anticuerpo. Después de una incubación adicional durante la noche de 18 h a 37 °C, 5 % de CO_2, se midió la liberación de LDH de células diana apoptóticas/necróticas en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se representa en la Figura 42, la construcción «2+1 IgG scFab» muestra una actividad citotóxica comparable a la molécula «$(scFv)_2$» en términos de valores de CE_{50}. La construcción «1+1 IgG scFab, con un brazo invertido» es menos activa que las otras construcciones probadas en este ensayo.

En otro conjunto de experimentos se comparó la construcción «2+1 IgG Crossfab, cadena ligera conectada» para CD3/MCSP (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 179) con la construcción «2+1 IgG Crossfab» para CD3/MCSP (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33). En resumen, las células diana (células de melanoma Colo-38 humanas, MV-3 humanas o WM266-4) se recogieron con tampón de disociación celular el día del ensayo (o con tripsina un día antes de que comenzara el ensayo), se lavaron y se volvieron a suspender en el medio de cultivo celular apropiado (RPMI1640, que incluye FCS al 2 % y Glutamax al 1 %). Se sembraron 20 000-30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano y se añadió la dilución de anticuerpo respectiva como se indicó (triplicados). Se añadieron PBMC como células efectoras para obtener una proporción final entre células efectoras y diana (E:T) de 10:1. Todas las construcciones y controles se ajustaron a la misma molaridad, el tiempo de incubación fue de 22 h. La detección de la liberación de LDH y la normalización se realizaron como se describe anteriormente.

Las Figuras 49 a 52 muestran el resultado de cuatro ensayos realizados con células de melanoma MV-3 (Figura 49), células Colo-38 (Figuras 50 y 51) o células WM266-4 (Figura 52). Como se muestra en la Figura 49, la construcción con la cadena ligera conectada fue menos potente en comparación con la que no tenía la cadena ligera conectada en el ensayo con células MV-3 como células diana. Como se muestra en las Figuras 50 y 51, la construcción con la cadena ligera conectada fue más potente en comparación con la que no tiene la cadena ligera conectada en los ensayos con células Colo-38 que expresan niveles altos de MCSP como células diana. Finalmente, como se muestra

en la Figura 52, no hubo diferencias significativas entre las dos construcciones cuando se usaron células WM266-4 que expresan niveles altos de MCSP como células diana.

En otro experimento se compararon dos construcciones «2+1 IgG Crossfab, invertida» dirigidas a CEA en las que en el fragmento Crossfab se habían intercambiado las regiones V (VL/VH, véase SEQ ID NO: 33, 63, 65, 67) o las regiones C (CL/CH1, véase SEQ ID NO: 65, 67, 183, 197). El ensayo se realizó como se describe anteriormente, usando PBMC humanas como células efectoras y células diana que expresan CEA humano. Las células diana (células tumorales MKN-45 o LS-174T) se recogieron con tripsina-EDTA (LuBiosciences n.º 25300-096), se lavaron y se resuspendieron en RPMI1640 (Invitrogen n.º 42404042), que incluye Glutamax al 1 % (LuBiosciences n.º 35050087) y FCS al 2 %. Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadieron las construcciones biespecíficas a las concentraciones indicadas. Todas las construcciones y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células efectoras PBMC humanas para obtener una proporción E:T final de 10:1, el tiempo de incubación fue de 28 h. Los valores de CE_{50} se calcularon usando el programa informático GraphPad Prism 5.

Como se muestra en la Figura 61, la construcción con el intercambio CL/CH1 muestra una actividad ligeramente mejor en ambas líneas celulares diana que la construcción con el intercambio VL/VH. Los valores de CE_{50} calculados fueron de 115 y 243 pM en células MKN-45 y de 673 y 955 pM en células LS-174T, para la construcción con intercambio CL/CH1 y la construcción con intercambio VL/VH, respectivamente.

De forma similar, se compararon dos construcciones «2+1 IgG Crossfab» dirigidas a MCSP, en las que en el fragmento Crossfab se habían intercambiado las regiones V (VL/VH, véase SEQ ID NO: 33, 189, 191, 193) o las regiones C (CL/CH1, véase SEQ ID NO: 183, 189, 193, 195). El ensayo se realizó como se describe anteriormente, usando PBMC humanas como células efectoras y células diana que expresan MCSP humano. Las células diana (WM266-4) se recogieron con tampón de disociación celular (LuBiosciences n.º 13151014), se lavaron y se resuspendieron en RPMI1640 (Invitrogen n.º 42404042), que incluye Glutamax al 1 % (LuBiosciences n.º 35050087) y FCS al 2 %. Se sembraron 30 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añadieron las construcciones a las concentraciones indicadas. Todas las construcciones y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron células efectoras PBMC humanas para obtener una proporción E:T final de 10:1, el tiempo de incubación fue de 26 h. Los valores de CE_{50} se calcularon usando el programa informático GraphPad Prism 5.

Como se muestra en la Figura 62, las dos construcciones muestran actividad comparable, la construcción con el intercambio CL/CH1 tiene un valor de CE_{50} ligeramente menor (12,9 pM para la construcción con el intercambio CL/CH1, en comparación con 16,8 pM para la construcción con el intercambio VL/VH).

La Figura 63 muestra el resultado de un ensayo similar, realizado con células diana MV-3 que expresan MCSP humano. De nuevo, ambas construcciones muestran actividad comparable, la construcción con el intercambio CL/CH1 tiene un valor de CE_{50} ligeramente inferior (aproximadamente 11,7 pM para la construcción con el intercambio CL/CH1, comparado con aproximadamente 82,2 pM para la construcción con el intercambio VL/VH). No se pudieron calcular los valores exactos de CE_{50}, ya que las curvas de muerte celular no alcanzaron una meseta a altas concentraciones de los compuestos.

En otro experimento, las construcciones «2+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33) y «1+1 IgG Crossfab» (véase SEQ ID NO: 5, 29, 33, 181) para CD3/MCSP se compararon con la construcción «1+1 CrossMab» para CD3/MCSP (véase SEQ ID NO: 5, 23, 183, 185). El ensayo se realizó como se describe anteriormente, usando PBMC humanas como células efectoras y células diana WM266-4 o MV-3 (proporción E:T = 10:1) y un tiempo de incubación de 21 h.

Como se muestra en la Figura 64, la construcción «2+1 IgG Crossfab» es la molécula más potente en este ensayo, seguida por la «1+1 IgG Crossfab» y la «1+1 CrossMab». Esta clasificación es aún más pronunciada con las células MV-3, que expresan niveles medios de MCSP, en comparación con las células WM266-4que expresan niveles altos de MCSP. Los valores de CE_{50} calculados fueron de 9,2, 40,9 y 88,4 pM en células MV-3 y de 33,1, 28,4 y 53,9 pM en células WM266-4, para las construcciones «2+1 IgG Crossfab», «1+1 IgG Crossfab» y «1+1 CrossMab», respectivamente.

En un experimento adicional se analizaron diferentes concentraciones de la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión LC» (SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213), usando células diana tumorales MKN-45 o LS-174T y células efectoras PBMC humanas a una proporción E:T de 10:1 y un tiempo de incubación de 28 horas. Como se muestra en la Figura 65, la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión LC» indujo la apoptosis en células diana MKN-45 con una CE_{50} calculada de 213 pM, mientras que la CE_{50} calculada es de 1,56 nM con células LS-174T, mostrando la influencia de los diferentes niveles de expresión del antígeno tumoral sobre la potencia de las construcciones biespecíficas dentro de un cierto período de tiempo.

En otro experimento más, la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión LC» (SEQ ID NO: 183, 209, 211, 213) se comparó con una molécula «2+1 IgG Crossfab» no dirigida. Se usaron células tumorales MC38-huCEA y PBMC humanas (proporción E:T = 10:1) y un tiempo de incubación de 24 horas. Como se muestra en la Figura 66, la construcción «1+1 IgG Crossfab, fusión LC» indujo la apoptosis de las células diana de una manera dependiente de la

concentración, con un valor de CE_{50} calculado de aproximadamente 3,2 nM. Por el contrario, la construcción «2+1 IgG Crossfab» no dirigida mostró la muerte de las células diana mediada por linfocitos T independiente de antígeno solo a la concentración más alta.

En un experimento final, las construcciones «2+1 IgG Crossfab (V9)» (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33), «2+1 IgG Crossfab, invertido (V9)» (SEQ ID NO: 5, 23, 183, 187), «2+1 IgG Crossfab (anti-CD3)» (SEQ ID NO: 5, 23, 215, 217) y «2+1 IgG Crossfab, invertido (anti-CD3)» (SEQ ID NO: 5, 23, 215, 219) se compararon utilizando células tumorales MVS3 o WM266-4 positivas para MCSP humano y PBMC humanas (proporción E:T = 10:1), y un tiempo de incubación de aproximadamente 24 horas. Como se representa en la Figura 67, la muerte mediada por linfocitos T de las construcciones «2+1 IgG Crossfab, invertida» parece ser ligeramente más fuerte o al menos igual a la inducida por las construcciones «2+1 IgG Crossfab» para ambos conectores CD3. Los valores de CE_{50} calculados fueron los siguientes:

CE_{50} [pM]	2+1 IgG Crossfab (V9)	2+1 IgG Crossfab, invertido (V9)	2+1 IgG Crossfab (anti-CD3)	2+1 IgG Crossfab, invertido (anti-CD3)
MV-3	10,0	4,1	11,0	3,0
WM266-4	12,4	3,7	11,3	7,1

Ejemplo 7

Ensayo de CD107a/b

La construcción purificada «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la molécula «$(scFv)_2$», ambas dirigidas a MCSP humano y CD3 humano, se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su potencial para regular por incremento los niveles de CD107a y perforina intracelular en presencia o ausencia de células tumorales que expresan MCSP humano.

En resumen, en el día 1, se sembraron 30 000 células tumorales diana Colo-38 por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO_2 para permitir la adhesión. Se aislaron linfocitos pan T humanos primarios el día 1 o el día 2 de capas leucocíticas, como se describe.

El día 2 se añadieron 0,15 millones de células efectoras por pocillo para obtener una proporción E:T final de 5:1. Se añadieron anticuerpos CD107a/b conjugados con FITC, así como las diferentes construcciones biespecíficas y controles. Las diferentes moléculas biespecíficas y los anticuerpos se ajustaron a la misma molaridad para obtener una concentración final de 9,43 nM. Después de una etapa de incubación de 1 h a 37 °C, 5% de CO_2, se añadió monensina para inhibir la secreción, pero también para neutralizar el pH dentro de los endosomas y los lisosomas. Después de un tiempo de incubación adicional de 5 h, las células se tiñeron a 4 °C durante 30 min para la expresión de CD8 en la superficie. Las células se lavaron con tampón de tinción (PBS/BSA al 0,1 %), se fijaron y se permeabilizaron durante 20 min usando el kit BD Cytofix/Cytoperm Plus con BD Golgi Stop (BD Biosciences n.º 554715). Las células se lavaron dos veces usando 1 x tampón BD Perm/Wash, y la tinción intracelular para la perforina se realizó a 4 °C durante 30 min. Después de una etapa de lavado final con 1 x tampón BD Perm/Wash, las células se resuspendieron en PBS/BSA al 0,1 % y se analizaron en un equipo FACS CantoII (todos los anticuerpos se adquirieron a BD Biosciences o BioLegend).

Las puertas se establecieron en todas las células positivas para CD107a/b, positivas para la perforina o positivas dobles, tal como se indica (Figura 43). La construcción «2+1 IgG scFab» fue capaz de activar linfocitos T y de regular por incremento los niveles de CD107a/b y de perforina intracelular solo en presencia de células diana (Figura 43A), mientras que la molécula «$(scFv)_2$» muestra (débil) inducción de la activación de linfocitos T también en ausencia de células diana (Figura 43B). La referencia bivalente de IgG anti-CD3 da como resultado un nivel de activación más bajo en comparación con la molécula «$(scFv)_2$» o la otra construcción biespecífica.

Ejemplo 8

Ensayo de proliferación

Las moléculas «2+1 IgG scFab» (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y «$(scFv)_2$» purificadas, ambas dirigidas a CD3 humano y a MCSP humano, se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su potencial para inducir la proliferación de linfocitos T $CD8^+$ o $CD4^+$ en presencia y ausencia de células tumorales que expresan MCSP humano.

En resumen, los linfocitos pan T humanos recién aislados se ajustaron a 1 millón de células por ml en PBS templado y se tiñeron con CFSE 1 µM a temperatura ambiente durante 10 minutos. El volumen de tinción se duplicó mediante la adición de medio RPMI1640, que contiene FCS al 10 % y GlutaMax al 1 %. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos adicionales, las células se lavaron tres veces con medio precalentado para eliminar el CFSE restante. Las células Colo-38 positivas para MCSP se recogieron con tampón de disociación celular, se contaron y se comprobó su viabilidad. Las células se ajustaron a 0,2 x 10^6 células (viables) por ml en medio AIM-V y se

pipetearon 100 µl de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (como se indica). Se añadieron 50 µl de las construcciones biespecíficas (diluidas) a los pocillos que contenían células para obtener una concentración final de 1 nM. Las células efectoras pan T humanas teñidas con CFSE se ajustaron a 2 x 10^6 células (viables) por ml en medio AIM-V. Se añadieron 50 µl de esta suspensión celular por pocillo de la placa de ensayo (véase más arriba) para obtener una proporción E:T final de 5:1. Para analizar si las construcciones biespecíficas son capaces de activar linfocitos T exclusivamente en presencia de células diana que expresan el antígeno tumoral huMCSP, se incluyeron pocillos que contenían 1 nM de las moléculas biespecíficas respectivas, así como PBMC, pero no células diana. Después de la incubación durante cinco días a 37 °C, 5 % de CO_2, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g) y se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que incluía BSA al 0,1 %. La tinción superficial para CD8 (IgG1,κ de ratón, clon HIT8a, BD n.º 555635), CD4 (IgG1,κ de ratón, clon RPA-T4, BD n.º 560649) o CD25 (IgG1,κ de ratón; clon M-A251; BD n.º 555434) se realizó a 4 °C durante 30 min de acuerdo con las sugerencias del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 %, se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron usando un equipo FACS CantoII (Software FACS Diva). El nivel de proliferación relativa se determinó estableciendo una puerta alrededor de las células no proliferantes y usando el número de célula de esta puerta en relación con el número total de células medidas como la referencia.

La Figura 44 muestra que todas las construcciones inducen la proliferación de linfocitos T $CD8^+$ (A) o linfocitos T $CD4^+$ (B) solo en presencia de células diana, de forma comparable a la molécula «$(scFv)_2$». En general, los linfocitos T $CD8^+$ activados proliferan más que los linfocitos T $CD4^+$ activados en este ensayo.

Ejemplo 9

Ensayo de liberación de citocinas

La construcción «2+1 IgG scFab» purificada (SEQ ID NO: 5, 17, 19) y la molécula «$(scFv)_2$», ambas dirigidas a MCSP humano y CD3 humano, se analizaron para determinar su capacidad de inducir la secreción *de novo* de citocinas mediada por linfocitos T en presencia o ausencia de células diana tumorales.

En resumen, se aislaron PBMC humanas de capas leucocíticas y se sembraron 0,3 millones de células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron células diana tumorales Colo-38, que expresan MCSP humano, para obtener una proporción E:T final de 10:1. Se añadieron las construcciones biespecíficas y los controles de IgG a una concentración final de 1 nM y las células se incubaron durante 24 h a 37 °C, 5 % de CO_2. Al día siguiente, las células se centrifugaron durante 5 min a 350 x g y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos de pocillos profundos para su posterior análisis. El análisis de CBA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el equipo FACS CantoII, usando el kit de citocinas Th1/Th2 humana II (BD n.º 551809).

La Figura 45 muestra los niveles de las diferentes citocinas medidos en el sobrenadante. En presencia de células diana, la citocina principal secretada tras la activación de los linfocitos T es IFN-γ. La molécula «$(scFv)_2$» induce un nivel ligeramente más alto de IFN-γ que la construcción «2+1 IgG scFab». La misma tendencia se puede encontrar para el TNF humano, pero los niveles globales de esta citocina fueron mucho más bajos en comparación con el IFN-γ. No hubo secreción significativa de citocinas Th2 (IL-10 e IL-4) tras la activación de los linfocitos T en presencia (o ausencia) de células diana. En ausencia de células diana Colo-38, solo se observó una inducción muy débil de la secreción de TNF, que fue más alta en las muestras tratadas con la molécula «$(scFv)_2$».

En un segundo experimento se analizaron las siguientes construcciones biespecíficas purificadas dirigidas a MCSP humano y CD3 humano: la construcción «2+1 IgG Crossfab» (SEQ ID NO: 3, 5, 29, 33), la molécula «$(scFv)_2$», así como diferentes moléculas «2+1 IgG scFab» que comprenden un dominio Fc natural o mutado (LALA, P329G y/o N297D, como se indica). En resumen, se sembraron 280 µl de sangre completa de un donante sano por pocillo de una placa de 96 pocillos de pocillos profundos. Se añadieron 30 000 células diana tumorales Colo-38, que expresan MCSP humano, así como las diferentes construcciones biespecíficas y controles de IgG a una concentración final de 1 nM. Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C, 5 % de CO_2 y después se centrifugaron durante 5 min a 350 x g. El sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos de pocillos profundos para su análisis posterior. El análisis de CBA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para un equipo FACS CantoII, usando la combinación de los siguientes CBA Flex Sets: granzima B humana (BD n.º 560304), Flex Set para IFN-γ humano (BD n.º 558269), Flex Set para TNF humano (BD n.º 558273), Flex Set para IL-10 humano (BD n.º 558274), Flex Set para IL-6 humano (BD n.º 558276), Flex Set para IL-4 humano (BD n.º 558272), Flex Set para IL-2 humano (BD n.º 558270).

La Figura 46 muestra los niveles de las diferentes citocinas medidos en el sobrenadante. La principal citocina secretada en presencia de células tumorales Colo-38 fue IL-6, seguida de IFN-γ. Además, también los niveles de granzima B aumentaron fuertemente con la activación de linfocitos T en presencia de células diana. En general, la molécula «$(scFv)_2$» indujo niveles más altos de secreción de citocinas en presencia de células diana (Figura 46, A y B). No hubo secreción significativa de citocinas Th2 (IL-10 e IL-4) tras la activación de los linfocitos T en presencia (o ausencia) de células diana.

En este ensayo hubo una secreción débil de IFN-γ, inducida por diferentes construcciones «2+1 IgG scFab», incluso en ausencia de células diana (Figura 46, C y D). En estas condiciones, no se pudieron observar diferencias

significativas entre las construcciones «2+1 IgG scFab» con un dominio Fc natural o mutado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Glycart AG

<120> Moléculas biespecíficas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T

<130> 30598

<150> EP 11178370.0

<151> 23-08-2011

<150> EP 12168192.8

<151> 16-05-2012

<160> 266

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 700

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
        435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
465                 470                 475                 480

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
                485                 490                 495
```

```
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
            500                 505                 510

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

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

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

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

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

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    690                 695                 700
```

<210> 2

<211> 2103

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 2

gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc 180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag 300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc 360

agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga 660

ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt 720

ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg 780

cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac 840

accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac 900

ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg 960

gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1020

gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg 1080

ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc 1140

ctggcaccct cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag 1200

gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg 1260

cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc 1320

gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc tacatctgca acgtgaatca caagcccagc 1380

aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca 1440

ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 1500

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 1560

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1620

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1680

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1740

ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1800

gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc 1860

gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1920

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg 1980

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 2040

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2100

tga 2103

<210> 3

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 3

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

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

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

```
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

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

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

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

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 4

<211> 1329

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 4

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac 180

aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240

ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac 300

tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc 360

ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa gacccacacc 660

tgtccccctt gccctgcccc tgaagctgct ggtggccctt ccgtgttcct gttccccccca 720

aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccccgaag tgacctgcgt ggtggtcgat 780

gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 840

aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020

ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1080

tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1200

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320

ggtaaataa 1329

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VL-CL)

<400> 5

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

```
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 6

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VL-CL)

<400> 6

```
gatattgtgc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc       60
atcagttgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagagacca      120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct      240
gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttggac gttcggtgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                      645
```

<210> 7

<211> 704

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (scFab)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 7

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
                245                 250                 255

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val
            260                 265                 270

Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln
        275                 280                 285

Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly
    290                 295                 300

Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg
305                 310                 315                 320

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            340                 345                 350

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        355                 360                 365

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    370                 375                 380

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                405                 410                 415

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            420                 425                 430

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        435                 440                 445

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Asp Lys Thr
465                 470                 475                 480
```

```
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
                485                 490                 495

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
            500                 505                 510

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 2115

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (scFab)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 8

gacatcgtgc tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcctgggcga cagagtgacc 60

atcagctgta gcgcctccca gggcatcaga aactacctga actggtatca gcagagaccc 120

gacggcacag tgaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcacagac tacagcctga ccatctccaa cctggaaccc 240

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacagcaagc tgccctggac cttcggcgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcggaccgtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccaccc 360

agcgacgagc agctgaagtc cggcacagcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgtccag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgagcagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gtagtggcgg aggctctggc 660

ggaggaagcg agggcggagg atctgaaggc ggcggatctg aggggggagg cagtgaaggg 720

ggaggctcag ggggaggatc cggcgaggtg cagctgcagg aatctggccc tggcctggtc 780

aagccaagcc agagtctgag cctgacctgc agcgtgaccg gctacagcat taccagcggc 840

tactactgga actggattcg gcagttcccc ggcaataagc tggaatggat gggctacatc 900

acctacgacg gcagcaacaa ctacaacccc agcctgaaga accggatcag catcacccgg 960

gacaccagca agaaccagtt cttcctgaag ctgaacagcg tgaccaccga ggacaccgcc 1020

acatactatt gcgccgactt cgactactgg ggccagggca ccaccctgac cgtgtccagc 1080

gccagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 1140

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 1200

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagagcagc 1260

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 1320

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 1380

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggtggat ccggagctca ggacaaaact 1440

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 1500

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1560

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1620

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1680

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1740

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1800

cgagaaccac aggtgtgcac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1860

agcctctcgt gcgcagtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1920

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1980

ttcttcctcg tgagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 2040

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 2100

tctccgggta aatga 2115

<210> 9

<211> 466

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VH-CH1)-Fc(botón) LALA

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

```
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
    130                 135                 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
            180                 185                 190

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

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

Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gln Asp
225                 230                 235                 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380
```

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 10

<211> 1401

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VH-CH1)-Fc(botón) LALA

<400> 10

gaggtgcagc tggtcgagag cggaggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

agctgcgccg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt ccggcaggca 120

cctggcaagg gactggaatg ggtggccctg atcaacccct acaagggcgt gagcacctac 180

aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agcgtggaca agagcaagaa caccgcctat 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcggc 300

tactacggcg acagcgactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccct cgtgaccgtg 360

tctagcgcta gcaccaaggg cccctccgtg ttccccctgg ccccagcag caagagcacc 420

agcggcggca cagccgctct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga gcccgtgacc 480

gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540

agttctggcc tgtatagcct gagcagcgtg gtcaccgtgc cttctagcag cctgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg 660

gagcccaaga gctgcgacgg cggtggtggc tccggaggcg gtggatccgg agctcaggac 720

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 780

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 840

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1140

caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380

tccctgtctc cgggtaaatg a 1401

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VL-CL)

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 12

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VL-CL)

<400> 12

```
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgccccagc     180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tgccctggac cttcggccag     300
ggcacaaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca     360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat     420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag     480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg     540
```

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 13

<211> 926

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) wt

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
```

```
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415
```

```
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

         435                 440                 445

 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
     450                 455                 460

 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 465                 470                 475                 480

 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
                 485                 490                 495

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

 Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn
         515                 520                 525

 Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr
     530                 535                 540

 Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
 545                 550                 555                 560

 Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala
                 565                 570                 575

 Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
             580                 585                 590

 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
         595                 600                 605

 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
     610                 615                 620

 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 625                 630                 635                 640

 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                 645                 650                 655
```

```
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            660                 665                 670

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        675                 680                 685

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    690                 695                 700
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
705                 710                 715                 720

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                725                 730                 735

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            740                 745                 750

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        755                 760                 765

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    770                 775                 780

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
785                 790                 795                 800

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                805                 810                 815

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            820                 825                 830

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
        835                 840                 845

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    850                 855                 860

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
865                 870                 875                 880

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                885                 890                 895

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            900                 905                 910
```

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
915 920 925

<210> 14

<211> 2781

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) wt

<400> 14

gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc 180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag 300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccc 360

agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga 660

ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt 720

ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg 780

cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac 840

accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac 900

ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg 960

gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1020

gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg 1080

ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc 1140

ctggccccca gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ccctcggctg cctggtcaag 1200

gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg 1260

cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtcacc 1320

gtgccctcca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aataccaagg tggacaagaa ggtggagccc aagagctgcg acggcggtgg tggctccgga 1440

ggcggtggat ctgaagtgca gctgcaggaa agcggccctg gcctggtcaa gcccagccag 1500

agcctgagcc tgacctgtag cgtgaccggc tactccatca cctccggcta ctactggaat 1560

tggattcggc agttccccgg caacaagctg gaatggatgg gctacatcac ctacgacggc 1620

agcaacaact acaaccccag cctgaagaac cggatcagca tcacccggga caccagcaag 1680

aaccagttct tcctgaagtt gaattctgtg actactgagg acacagctac atattactgt 1740

gcggactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc tagcaccaag 1800

ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 1860

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 1920

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 1980

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 2040

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 2100

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 2160

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 2220

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 2280

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 2340

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 2400

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 2460

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 2520

caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 2580

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 2640

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 2700

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 2760

tccctgtctc cgggtaaatg a 2781

<210> 15

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) wt

<400> 15

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

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

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

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

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

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 16

<211> 1329

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) wt

<400> 16

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac 180

aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240

ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac 300

tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcta gcaccaaggg cccaagcgtg 360

ttccctctgg cccccagcag caagagcaca agcggcggaa cagccgccct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga gcccgtgaca gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc 480

ggcgtgcaca cctttccagc cgtgctgcag agcagcggcc tgtacagcct gagcagcgtg 540

gtcacagtgc ctagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc 660

tgtccccctt gtcctgcccc tgagctgctg ggcggaccca gcgtgttcct gttccccccа 720

aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggac 780

gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaggtgcac 840

aatgccaaga ccaagccccg ggaggaacag tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg 900

ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaagagt acaagtgcaa ggtctccaac 960

aaggccctgc ctgcccccat cgagaaaacc atcagcaagg ccaagggcca gcccagagaa 1020

ccccaggtgt gcaccctgcc ccccagcaga gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg 1080

agctgtgccg tcaagggctt ctaccccagc gatatcgccg tggagtggga gagcaacggc 1140

cagcctgaga acaactacaa gaccacccсc cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc 1200

ctggtgtcca aactgaccgt ggacaagagc cggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc 1260

agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacacccaga agtccctgag cctgagcccc 1320

ggcaagtga 1329

<210> 17

<211> 926

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) LALA

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
```

```
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
        435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480
```

```
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
                485                 490                 495

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

Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn
        515                 520                 525

Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr
    530                 535                 540

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
545                 550                 555                 560

Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala
                565                 570                 575

Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
            580                 585                 590

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        595                 600                 605

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    610                 615                 620

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
625                 630                 635                 640

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                645                 650                 655

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            660                 665                 670

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        675                 680                 685

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    690                 695                 700

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
705                 710                 715                 720

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                725                 730                 735
```

```
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            740                 745                 750

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        755                 760                 765

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    770                 775                 780

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
785                 790                 795                 800

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                805                 810                 815

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            820                 825                 830

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
        835                 840                 845

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    850                 855                 860

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
865                 870                 875                 880

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                885                 890                 895

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            900                 905                 910

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        915                 920                 925
```

<210> 18

<211> 2781

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) LALA

<400> 18

```
gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc     180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tccctggac cttcggccag      300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc     360
agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac     420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag     480
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc     540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc     600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga     660
ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt     720
ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg     780
cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac     840
accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac     900
ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg     960
gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc    1020
gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg    1080
ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggccccтc cgtgttcccc    1140
ctggcccccа gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ccctcggctg cctggtcaag    1200
gactacttcc ccgagccccgt gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg    1260
cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtcacc    1320
gtgccctcca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc    1380
aataccaagg tggacaagaa ggtggagccc aagagctgcg acggcggtgg tggctccgga    1440
ggcggtggat ctgaagtgca gctgcaggaa agcggccctg gcctggtcaa gcccagccag    1500
agcctgagcc tgacctgtag cgtgaccggc tactccatca cctccggcta ctactggaat    1560
tggattcggc agttccccgg caacaagctg gaatggatgg gctacatcac ctacgacggc    1620
agcaacaact acaaccccag cctgaagaac cggatcagca tcacccggga caccagcaag    1680
aaccagttct tcctgaagtt gaattctgtg actactgagg acacagctac atattactgt    1740
gcggactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc tagcaccaag    1800
```

```
ggcccatcgg tcttcccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc     1860

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc     1920

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc     1980

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac     2040

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac     2100

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc     2160

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccccctga ggtcacatgc     2220

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc     2280

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt     2340

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc     2400

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg     2460

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac     2520

caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg     2580

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     2640

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac     2700

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     2760

tccctgtctc cgggtaaatg a                                               2781
```

<210> 19

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) LALA

<400> 19

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
```

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

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

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

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305                 310                 315                 320
```

```
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

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

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 20

<211> 1329

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) LALA

<400> 20

```
gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc       60

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag      120

tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac      180

aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc      240

ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac      300

tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc      360

ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg       420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc      480
```

```
ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg      540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag      600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca      660

tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttccccca       720

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac      780

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat      840

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc      900

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      960

aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa      1020

ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc      1080

tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg      1140

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc      1200

ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc      1260

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg      1320

ggtaaatga                                                             1329
```

<210> 21

<211> 926

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 21

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300
```

```
Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
        435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
                485                 490                 495

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

Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn
        515                 520                 525

Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr
    530                 535                 540
```

```
Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
545                 550                 555                 560

Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala
                565                 570                 575

Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
            580                 585                 590

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        595                 600                 605

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    610                 615                 620

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
625                 630                 635                 640

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                645                 650                 655

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            660                 665                 670

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        675                 680                 685

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    690                 695                 700

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
705                 710                 715                 720

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                725                 730                 735

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            740                 745                 750

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        755                 760                 765

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    770                 775                 780

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
785                 790                 795                 800
```

```
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                805                 810                 815

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            820                 825                 830

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
        835                 840                 845

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    850                 855                 860

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
865                 870                 875                 880

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                885                 890                 895

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            900                 905                 910

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        915                 920                 925
```

<210> 22

<211> 2781

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 22

```
gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc       60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc      120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc      180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc      240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag      300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc      360

agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac      420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag      480
```

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga 660

ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt 720

ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg 780

cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac 840

accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac 900

ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg 960

gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1020

gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg 1080

ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc 1140

ctggccccca gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ccctcggctg cctggtcaag 1200

gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg 1260

cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtcacc 1320

gtgccctcca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aataccaagg tggacaagaa ggtggagccc aagagctgcg acggcggtgg tggctccgga 1440

ggcggtggat ctgaagtgca gctgcaggaa agcggccctg gcctggtcaa gcccagccag 1500

agcctgagcc tgacctgtag cgtgaccggc tactccatca cctccggcta ctactggaat 1560

tggattcggc agttccccgg caacaagctg gaatggatgg gctacatcac ctacgacggc 1620

agcaacaact acaaccccag cctgaagaac cggatcagca tcacccggga caccagcaag 1680

aaccagttct tcctgaagtt gaattctgtg actactgagg acacagctac atattactgt 1740

gcggactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc tagcaccaag 1800

ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 1860

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 1920

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 1980

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 2040

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 2100

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 2160

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccccctga ggtcacatgc 2220

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 2280

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 2340

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 2400

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 2460

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 2520

caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 2580

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 2640

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 2700

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 2760

tccctgtctc cgggtaaatg a 2781

<210> 23

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 23

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

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

```
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

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

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

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

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365
```

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

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

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 24

<211> 1329

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 24

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac 180

aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240

ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac 300

tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc 360

ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 660

tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 720

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 780

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020

ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc 1080

tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1200

ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320

ggtaaatga 1329

<210> 25

<211> 926

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA N297D

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
    370                 375                 380
```

```
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
        435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
                485                 490                 495

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

Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn
        515                 520                 525

Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr
    530                 535                 540

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
545                 550                 555                 560

Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala
                565                 570                 575

Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
            580                 585                 590

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        595                 600                 605

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    610                 615                 620
```

```
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
625                 630                 635                 640

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                645                 650                 655

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            660                 665                 670

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        675                 680                 685

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    690                 695                 700

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
705                 710                 715                 720

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                725                 730                 735

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            740                 745                 750

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        755                 760                 765

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    770                 775                 780

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
785                 790                 795                 800

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                805                 810                 815

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            820                 825                 830

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
        835                 840                 845

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    850                 855                 860

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
865                 870                 875                 880
```

```
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                805                 810                 815

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            820                 825                 830

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
        835                 840                 845

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    850                 855                 860

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
865                 870                 875                 880

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                885                 890                 895

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            900                 905                 910

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        915                 920                 925
```

<210> 26

<211> 2781

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-LC007 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA N297D

<400> 26

```
gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc       60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc      120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc      180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc      240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag      300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccccc      360

agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac      420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag      480

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc      540
```

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga 660

ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt 720

ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg 780

cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac 840

accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac 900

ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg 960

gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1020

gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg 1080

ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc 1140

ctggccccca gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ccctcggctg cctggtcaag 1200

gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg 1260

cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtcacc 1320

gtgccctcca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aataccaagg tggacaagaa ggtggagccc aagagctgcg acggcggtgg tggctccgga 1440

ggcggtggat ctgaagtgca gctgcaggaa agcggccctg gcctggtcaa gcccagccag 1500

agcctgagcc tgacctgtag cgtgaccggc tactccatca cctccggcta ctactggaat 1560

tggattcggc agttccccgg caacaagctg gaatggatgg gctacatcac ctacgacggc 1620

agcaacaact acaaccccag cctgaagaac cggatcagca tcacccggga caccagcaag 1680

aaccagttct tcctgaagtt gaattctgtg actactgagg acacagctac atattactgt 1740

gcggactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc tagcaccaag 1800

ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 1860

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 1920

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 1980

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 2040

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 2100

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 2160

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 2220

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 2280

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacgacag cacgtaccgt 2340

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 2400

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 2460

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 2520

caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 2580

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 2640

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 2700

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 2760

tccctgtctc cgggtaaatg a 2781

<210> 27

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA N297D

<400> 27

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

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

```
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

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

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

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

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365
```

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

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

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 28

<211> 1329

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA N297D

<400> 28

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac 180

aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240

ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac 300

tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc 360

ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 660

tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 720

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 780

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacgacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020

ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc 1080

tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1200

ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320

ggtaaatga 1329

<210> 29

<211> 664

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VL-CH1)-LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 29

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145                 150                 155                 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
            180                 185                 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
        195                 200                 205

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

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

Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr
                245                 250                 255

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly
            260                 265                 270

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
        275                 280                 285

Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys
    290                 295                 300

Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp
305                 310                 315                 320

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser
                325                 330                 335

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
            340                 345                 350

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
        355                 360                 365
```

```
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
    370                 375                 380

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
            420                 425                 430

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
        435                 440                 445

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    450                 455                 460

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
465                 470                 475                 480

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                485                 490                 495

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
            500                 505                 510

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        515                 520                 525

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    530                 535                 540

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
545                 550                 555                 560

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
                565                 570                 575

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            580                 585                 590

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        595                 600                 605
```

```
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
    610                 615                 620

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
625                 630                 635                 640

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                645                 650                 655

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            660
```

<210> 30

<211> 1995

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VL-CH1)-LC007 (VL-CH1)-Fc(ojal) p329G LALA

<400> 30

```
gatatccaga tgacccagag ccccagctct ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tggaaagcgg cgtgccctcc     180
agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240
gaggatttcg ccacatatta ctgccagcag ggcaataccc tgccctggac cttcggacag     300
ggcacaaaag tggaaatcaa gagcagcgct tccaccaaag gcccttccgt gtttcctctg     360
gctcctagct ccaagtccac ctctggaggc accgctgctc tcggatgcct cgtgaaggat     420
tattttcctg agcctgtgac agtgtcctgg aatagcggag cactgacctc tggagtgcat     480
actttccccg ctgtgctgca gtcctctgga ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgacagtg     540
cccagcagca gcctgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac     600
accaaggtgg acaagaaggt ggaacccaag tcttgtggcg gaggcggatc cggcggaggg     660
ggatctgagg tgcagctgca ggaaagcggc cctggcctgg tgaaacccag ccagagcctg     720
agcctgacct gcagcgtgac cggctacagc atcaccagcg gctactactg gaactggatc     780
agacagttcc ccggcaacaa gctggaatgg atgggctaca tcacctacga cggcagcaac     840
aactacaacc ccagcctgaa gaacagaatc agcatcaccc gggacaccag caagaaccag     900
ttcttcctga agctgaacag cgtgaccacc gaggacaccg ccacctacta ctgcgccgac     960
ttcgactact ggggccaggg caccaccctg accgtgtcct ccgcctctac caagggcccc    1020
```

agcgtgttcc ccctggcacc cagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cgctctgggc 1080

tgtctggtga aagactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cttggaactc tggcgccctg 1140

accagcggcg tgcacacctt ccagccgtg ctgcagagca gcggcctgta ctccctgtcc 1200

tccgtggtca ccgtgccctc tagctccctg ggaacacaga catatatctg taatgtcaat 1260

cacaagcctt ccaacaccaa agtcgataag aaagtcgagc ccaagagctg cgacaaaact 1320

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 1380

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1440

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1500

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1560

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1620

tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1680

cgagaaccac aggtgtgcac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1740

agcctctcgt gcgcagtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1800

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1860

ttcttcctcg tgagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1920

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1980

tctccgggta aatga 1995

<210> 31

<211> 229

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc(botón) wt

<400> 31

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys Ser Gly
225
```

<210> 32

<211> 690

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc(botón) wt

<400> 32

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa atccggatga 690

<210> 33

<211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VH-CL)

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
    130                 135                 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
145                 150                 155                 160

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
225
```

<210> 34

<211> 690

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VH-CL)

<400> 34

gaggtgcagc tggtcgagag cggaggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

agctgcgccg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt ccggcaggca 120

cctggcaagg gactggaatg ggtggccctg atcaacccct acaagggcgt gagcacctac 180

aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agcgtggaca agagcaagaa caccgcctat 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcggc 300

tactacggcg acagcgactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccct cgtgaccgtg 360

tctagcgcta gcgtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg 420

aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 480

gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag 540

caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac 600

tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc 660

acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 690

<210> 35

<211> 670

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FN18 (VL-CH1)-LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) pp329G LALA

<400> 35

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
            20                  25                  30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Asn Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

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

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

Phe Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    210                 215                 220

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

```
Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser
                245                 250                 255

Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn
            260                 265                 270

Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr
        275                 280                 285

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
    290                 295                 300

Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala
305                 310                 315                 320

Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
                325                 330                 335

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
            340                 345                 350

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
        355                 360                 365

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

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
385                 390                 395                 400

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
                405                 410                 415

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
            420                 425                 430

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
        435                 440                 445

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
    450                 455                 460

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
465                 470                 475                 480

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
                485                 490                 495
```

```
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
            500                 505                 510

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

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
    530                 535                 540

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
545                 550                 555                 560

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
                565                 570                 575

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
            580                 585                 590

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
        595                 600                 605

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

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
625                 630                 635                 640

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
                645                 650                 655

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            660                 665                 670
```

<210> 36

<211> 2013

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FN18 (VL-CH1)-LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) pp329G LALA

<400> 36

```
gacatcgtga tgagccagag ccccagcagc ctggccgtgt ccgtgggcga gaaagtgacc      60
atgagctgca agagcagcca gagcctgctg tactcctcta accagaagaa ctacctggcc     120
tggtatcagc agaagcccgg ccagtccccc aagctgctga tcaactgggc cagcacccgc     180
gagagcggcg tgcccgatag attcacaggc agcggcagcc ggaccgactt caccctgacc     240
atcagcagcg tgaaggccga ggatctggcc gtgtacttct gccagcagtt ctacagctac     300
ccccccacct tcggcggagg cacgaagctg gaaatcaaga gcagcgcttc caccaaaggc     360
ccttccgtgt ttcctctggc tcctagctcc aagtccacct ctggaggcac cgctgctctc     420
ggatgcctcg tgaaggatta ttttcctgag cctgtgacag tgtcctggaa tagcggagca     480
ctgacctctg gagtgcatac tttccccgct gtgctgcagt cctctggact gtacagcctg     540
agcagcgtgg tgacagtgcc cagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg     600
aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg aacccaagtc ttgtggcgga     660
ggcggatccg gcggaggggg atctgaggtg cagctgcagg aaagcggccc tggcctggtg     720
aaacccagcc agagcctgag cctgacctgc agcgtgaccg gctacagcat caccagcggc     780
tactactgga actggatcag acagttcccc ggcaacaagc tggaatggat gggctacatc     840
acctacgacg gcagcaacaa ctacaacccc agcctgaaga acagaatcag catcacccgg     900
gacaccagca agaaccagtt cttcctgaag ctgaacagcg tgaccaccga ggacaccgcc     960
acctactact gcgccgactt cgactactgg ggccagggca ccaccctgac cgtgtcctcc    1020
gcctctacca agggccccag cgtgttcccc ctggcaccca gcagcaagag cacatctggc    1080
ggaacagccg ctctgggctg tctggtgaaa gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtct    1140
tggaactctg gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagccgtgct gcagagcagc    1200
ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtcacc gtgccctcta gctccctggg aacacagaca    1260
tatatctgta atgtcaatca caagccttcc aacaccaaag tcgataagaa agtcgagccc    1320
aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga    1380
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct    1440
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg    1500
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac    1560
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag    1620
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc    1680
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag    1740
ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc    1800
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg    1860
```

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1920

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1980

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 2013

<210> 37

<211> 231

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FN18 (VH-CL)

<400> 37

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Ser Ser Glu Ser Thr Glu Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
145                 150                 155                 160
```

```
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
                165                 170                 175

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
            180                 185                 190

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
    210                 215                 220
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 38

<211> 696

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FN18 (VH-CL)

<400> 38

```
caggtgcagc tgcagcagag cgaggccgag ctggctagac ctggagccag cgtgaagatg       60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacacca tccactggct gaagcagcgg      120
cctggacagg gcctggactg gatcggctac ttcaacccca gcagcgagag caccgagtac      180
aaccggaagt tcaaggaccg gaccatcctg accgccgaca gaagcagcac caccgcctac      240
atgcagctga gcagcctgac cagcgaggac agcgccgtgt actactgcag ccggaagggc      300
gagaagctgc tgggcaacag atactggtac ttcgacgtgt ggggagccgg caccagcgtg      360
accgtgtcta gcgctagcgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag      420
cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta tcccagagag      480
gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc      540
acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa      600
gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg      660
cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttga                                696
```

<210> 39

<211> 664

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2C11 (VL-CH1)-LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) pp329G LALA

<400> 39

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
            100                 105                 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145                 150                 155                 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
            180                 185                 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
```

```
        195                 200                 205

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

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

Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr
                245                 250                 255

Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly
            260                 265                 270

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
        275                 280                 285

Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys
    290                 295                 300

Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp
305                 310                 315                 320

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser
                325                 330                 335

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
            340                 345                 350

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
    370                 375                 380

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
            420                 425                 430

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
        435                 440                 445
```

```
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    450                 455                 460

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
465                 470                 475                 480

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                485                 490                 495

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
            500                 505                 510

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        515                 520                 525

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    530                 535                 540

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
545                 550                 555                 560

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
                565                 570                 575

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            580                 585                 590

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        595                 600                 605

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
    610                 615                 620

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
625                 630                 635                 640

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                645                 650                 655

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            660
```

<210> 40

<211> 1995

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2C11 (VL-CH1)-LC007 (VH-CH1)-Fc(ojal) p329G LALA

<400> 40

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgcctgcca gcctgggcga cagagtgacc 60

atcaactgcc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accaacaagc tggccgacgg cgtgcccagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcagagac agcagcttca ccatctccag cctggaaagc 240

gaggacatcg gcagctacta ctgccagcag tactacaact acccctggac cttcggccct 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gagcagcgct tccaccaaag gcccttccgt gtttcctctg 360

gctcctagct ccaagtccac ctctggaggc accgctgctc tcggatgcct cgtgaaggat 420

tattttcctg agcctgtgac agtgtcctgg aatagcggag cactgacctc tggagtgcat 480

actttccccg ctgtgctgca gtcctctgga ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgacagtg 540

cccagcagca gcctgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac 600

accaaggtgg acaagaaggt ggaacccaag tcttgtggcg gaggcggatc cggcggaggg 660

ggatctgagg tgcagctgca ggaaagcggc cctggcctgg tgaaacccag ccagagcctg 720

agcctgacct gcagcgtgac cggctacagc atcaccagcg gctactactg gaactggatc 780

agacagttcc ccggcaacaa gctggaatgg atgggctaca tcacctacga cggcagcaac 840

aactacaacc ccagcctgaa gaacagaatc agcatcaccc gggacaccag caagaaccag 900

ttcttcctga agctgaacag cgtgaccacc gaggacaccg ccacctacta ctgcgccgac 960

ttcgactact ggggccaggg caccaccctg accgtgtcct ccgcctctac caagggcccc 1020

agcgtgttcc ccctggcacc cagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cgctctgggc 1080

tgtctggtga aagactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cttggaactc tggcgccctg 1140

accagcggcg tgcacacctt ccagccgtg ctgcagagca gcggcctgta ctccctgtcc 1200

tccgtggtca ccgtgccctc tagctccctg ggaacacaga catatatctg taatgtcaat 1260

cacaagcctt ccaacaccaa agtcgataag aaagtcgagc ccaagagctg cgacaaaact 1320

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 1380

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1440

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1500

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1560

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1620

tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1680

cgagaaccac aggtgtgcac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1740

agcctctcgt gcgcagtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1800

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1860

ttcttcctcg tgagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1920

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1980

tctccgggta aatga 1995

<210> 41

<211> 223

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2C11 (VH-CL)

<400> 41

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

```
Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
        115                 120                 125

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

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

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
                165                 170                 175

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

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
        195                 200                 205

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210                 215                 220
```

<210> 42

<211> 672

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2C11 (VH-CL)

<400> 42

```
gaggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ccggcaagag cctgaagctg      60
agctgcgagg ccagcggctt caccttcagc ggctacggca tgcactgggt gagacaggcc     120
cctggcagag gactggaaag cgtggcctac atcaccagca gcagcatcaa cattaagtac     180
gccgacgccg tgaagggccg gttcaccgtg tccagggata acgccaagaa cctgctgttc     240
ctgcagatga acatcctgaa gtccgaggac accgctatgt attactgcgc cagattcgac     300
tgggacaaga actactgggg ccagggcacc atggtcacag tgtctagcgc tagcgtggct     360
gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct     420
gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat     480
aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc     540
```

acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 600

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 660

ggagagtgtt ga 672

<210> 43

<211> 700

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
```

```
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335
```

```
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
        435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
465                 470                 475                 480

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
                485                 490                 495

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
            500                 505                 510

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

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

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

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

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

```
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    690                 695                 700
```

<210> 44

<211> 2103

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 44

```
gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc     180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag     300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc     360

agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac     420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag     480
```

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga 660

ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt 720

ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg 780

cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac 840

accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac 900

ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg 960

gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1020

gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg 1080

ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggccctag cgtgttccct 1140

ctggccccta gcagcaagag cacaagtgga ggaacagccg ccctgggctg cctggtcaag 1200

gactacttcc ccgagccccgt gaccgtgtcc tggaattctg gcgccctgac aagcggcgtg 1260

cacacatttc cagccgtgct gcagagcagc ggcctgtact ctctgagcag cgtcgtgacc 1320

gtgccctcta gctctctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aacaccaaag tggacaagaa ggtggaaccc aagagctgcg acaagaccca cacctgtccc 1440

ccttgccctg cccctgaagc tgctggtggc ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc 1500

aaggacaccc tgatgatcag ccggacccccc gaagtgacct gcgtggtggt cgatgtgtcc 1560

cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc 1620

aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1680

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1740

ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1800

gtgtacaccc tgccccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc 1860

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1920

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1980

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 2040

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2100

taa 2103

<210> 45

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 45

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

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

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
            340                 345                 350

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

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

Gly Lys
450

<210> 46

<211> 1353

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 46

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt cacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1353

<210> 47

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 (VL-CL)

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175
```

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 48

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 (VL-CL)

<400> 48

gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc 300

accaagctcg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 642

<210> 49

<211> 697

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 (scFab)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly
    210                 215                 220
```

```
Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
            260                 265                 270

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
        275                 280                 285

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
305                 310                 315                 320

Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
                325                 330                 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr
            340                 345                 350

Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
        355                 360                 365

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

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
                405                 410                 415

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
            420                 425                 430

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
        435                 440                 445

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
    450                 455                 460

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
465                 470                 475                 480
```

```
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                485                 490                 495

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            500                 505                 510

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

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

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

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

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            580                 585                 590

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    610                 615                 620

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    690                 695
```

<210> 50

<211> 2094

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 (scFab)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 50

gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc 300

accaagctcg agatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt ccccccccagc 360

gacgagcagc tgaaatctgg caccgccagc gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggaa 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctatagcc tgtccagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 600

agcagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgca gcggcggagg tagcggaggc 660

ggctctgagg gcggaggaag cgagggcgga ggctccgaag gcggcggaag cgaaggtggc 720

ggctctggcg gcggatccgg ccaggtgcag ctggtgcagt ctggggctga ggtgaagaag 780

cctgggtcct cggtgaaggt ctcctgcaag gcctctggtt tcacattcac tgactacaag 840

atacactggg tgcgacaggc ccctggacaa gggctcgagt ggatgggata tttcaaccct 900

aacagcggtt atagtaccta cgcacagaag ttccagggca gggtcaccat taccgcggac 960

aaatccacga gcacagccta catggagctg agcagcctga gatctgagga cacggccgtg 1020

tattactgtg cgagactatc cccaggcggt tactatgtta tggatgcctg gggccaaggg 1080

accaccgtga ccgtctcctc agctagcacc aagggcccta gcgtgttccc tctggccccct 1140

agcagcaaga gcacaagtgg aggaacagcc gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc 1200

cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaattct ggcgccctga caagcggcgt gcacacattt 1260

ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac tctctgagca gcgtcgtgac cgtgccctct 1320

agctctctgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaaa 1380

gtggacaaga aggtggaacc caagagctgc gacaagaccc acacctgtcc ccttgccct 1440

gcccctgaag ctgctggtgg ccctccgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc 1500

ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc tgcgtggtgg tcgatgtgtc ccacgaggac 1560

cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaatgc caagaccaag 1620

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1680

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc 1740

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1800

ctgccccccat gccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa 1860

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1920

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1980

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 2040

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa ataa 2094

<210> 51

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

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

```
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
    130                 135                 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
            180                 185                 190

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

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
    290                 295                 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                 310                 315                 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
                325                 330                 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            340                 345                 350

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

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380
```

```
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 52

<211> 1359

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 52

```
gaggtgcagc tggtcgagag cggaggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg      60
agctgcgccg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt ccggcaggca     120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccctg atcaacccct acaagggcgt gagcacctac     180
aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agcgtggaca agagcaagaa caccgcctat     240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcggc     300
tactacggcg acagcgactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccct cgtgaccgtg     360
tctagcgcta gcaccaaggg ccccтccgtg ttccccctgg ccccccagcag caagagcacc     420
agcggcggca cagccgctct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga gcccgtgacc     480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag     540
agttctggcc tgtatagcct gagcagcgtg gtcaccgtgc cttctagcag cctgggcacc     600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg     660
gagcccaaga gctgcgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca     720
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg     780
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc     840
```

```
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag      900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcg gcgccccat cgagaaaacc      1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg      1080
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc      1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct      1200
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc      1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac      1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga                              1359
```

<210> 53

<211> 934

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-GA201 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350
```

```
Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
        435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
                485                 490                 495

Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr
            500                 505                 510

Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
        515                 520                 525

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr
    530                 535                 540

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr
545                 550                 555                 560

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
                565                 570                 575

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp
            580                 585                 590

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        595                 600                 605
```

```
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    610                 615                 620

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
625                 630                 635                 640

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                645                 650                 655

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            660                 665                 670

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        675                 680                 685

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    690                 695                 700

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
705                 710                 715                 720

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                725                 730                 735

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            740                 745                 750

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        755                 760                 765

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    770                 775                 780

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
785                 790                 795                 800

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
                805                 810                 815

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            820                 825                 830

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
        835                 840                 845

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    850                 855                 860
```

```
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
865                 870                 875                 880

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                885                 890                 895

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            900                 905                 910

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        915                 920                 925

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    930
```

<210> 54

<211> 2805

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-GA201 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 54

```
gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgccccagc     180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag     300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc     360
agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac     420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag     480
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc     540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc     600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga     660
ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt     720
ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg     780
cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac     840
```

accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac 900

ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg 960

gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1020

gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg 1080

ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc 1140

ctggccccca gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ccctcggctg cctggtcaag 1200

gactacttcc ccgagccgct gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg 1260

cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtcacc 1320

gtgccctcca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aataccaagg tggacaagaa ggtggagccc aagagctgcg acggcggtgg tggctccgga 1440

ggcggtggat ctcaggtgca gctggtgcag tctggggctg aggtgaagaa gcctgggtcc 1500

tcggtgaagg tctcctgcaa ggcctctggt ttcacattca ctgactacaa gatacactgg 1560

gtgcgacagg cccctggaca agggctcgag tggatgggat atttcaaccc taacagcggt 1620

tatagtacct acgcacagaa gttccagggc agggtcacca ttaccgcgga caaatccacg 1680

agcacagcct acatggagct gagcagcctg agatctgagg acacggccgt gtattactgt 1740

gcgagactat ccccaggcgg ttactatgtt atggatgcct ggggccaagg gaccaccgtg 1800

accgtctcct cagctagcac caagggcccc tccgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag 1860

agcaccagcg gcggcacagc cgctctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgagccc 1920

gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg acctccggcg tgcacacctt ccccgccgtg 1980

ctgcagagtt ctggcctgta tagcctgagc agcgtggtca ccgtgccttc tagcagcctg 2040

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 2100

aaggtggagc ccaagagctg cgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 2160

gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 2220

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 2280

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 2340

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 2400

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag 2460

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 2520

tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat 2580

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 2640

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 2700

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2760

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga 2805

<210> 55

<211> 694

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 (scFab)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 55

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
            20                  25                  30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
                85                  90                  95

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

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

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
```

```
145                 150                 155                 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225                 230                 235                 240

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

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
            260                 265                 270

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
        275                 280                 285

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
305                 310                 315                 320

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
                325                 330                 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn
            340                 345                 350

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        355                 360                 365

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                405                 410                 415
```

```
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            420                 425                 430

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        435                 440                 445

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    450                 455                 460

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
465                 470                 475                 480

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                485                 490                 495

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            500                 505                 510

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        515                 520                 525

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    530                 535                 540

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
545                 550                 555                 560

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
                565                 570                 575

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            580                 585                 590

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
        595                 600                 605

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    610                 615                 620

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
625                 630                 635                 640

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            660                 665                 670
```

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
675 680 685

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690

<210> 56

<211> 2085

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 (scFab)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 56

gagatcgtgc tgacacagag ccccggaacc ctgtctctga gccctggcga aagagccacc 60

ctgagctgta gagccagcca gagcgtgacc agcagctacc tggcctggta tcagcagaag 120

cctggacagg cccccagact gctgatcaat gtgggcagca gacgggccac cggcatccct 180

gatagatttt ctggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagactggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcatca tgctgccccc tacatttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggccgctc ccagcgtgtt catcttccca 360

cctagcgacg agcagctgaa gtctggcaca gccagcgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420

taccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc 480

caggaaagcg tcaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg 540

accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag 600

ggcctgtcta gccccgtgac caagagcttc aaccggggag aatgtggcgg cggaggatct 660

ggtggcggag gtagtggtgg tggtggatct ggcggaggcg gatccggcgg aggtggaagc 720

ggaggtggtg gaagtggggg agaagtgcag ctgctggaaa gtggcggagg cctggtgcag 780

cctggcggat ctctgagact gagctgtgcc gccagcggct tcacctttag cagctacgcc 840

atgagctggg tccgacaggc ccctggaaag ggactggaat gggtgtccgc catctctggc 900

tctggcggca gcacctacta cgccgatagc gtgaagggcc ggttcaccat cagccgggac 960

aacagcaaga acaccctgta cctgcagatg aacagcctgc gggccgagga taccgccgtg 1020

tattattgcg ccaagggatg gttcggcggc ttcaactatt ggggccaggg aaccctggtc 1080

accgtgtcta gtgctagcac caagggccct agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag 1140

agcacaagtg gaggaacagc cgccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgagccc 1200

gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg acaagcggcg tgcacacatt tccagccgtg 1260

ctgcagagca gcggcctgta ctctctgagc agcgtcgtga ccgtgccctc tagctctctg 1320

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa agtggacaag 1380

aaggtggaac ccaagagctg cgacaagacc cacacctgtc ccccttgccc tgcccctgaa 1440

gctgctggtg gcccttccgt gttcctgttc ccccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1500

agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtcgatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1560

aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaatg ccaagaccaa gccgcgggag 1620

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1680

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag 1740

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1800

tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat 1860

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1920

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1980

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2040

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aataa 2085

<210> 57

<211> 931

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-3F2 (VH-CH1)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 57

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

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

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

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

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
225                 230                 235                 240

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
        275                 280                 285

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
    290                 295                 300
```

```
Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
305                 310                 315                 320

Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                325                 330                 335

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
            340                 345                 350

Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                405                 410                 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
        435                 440                 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    450                 455                 460

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
                485                 490                 495

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
            500                 505                 510

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
        515                 520                 525

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
    530                 535                 540

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
545                 550                 555                 560
```

```
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
                565                 570                 575

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly
            580                 585                 590

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        595                 600                 605

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    610                 615                 620

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
625                 630                 635                 640

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                645                 650                 655

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            660                 665                 670

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        675                 680                 685

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    690                 695                 700

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
705                 710                 715                 720

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                725                 730                 735

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            740                 745                 750

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        755                 760                 765

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    770                 775                 780

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
785                 790                 795                 800

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
                805                 810                 815
```

```
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            820                 825                 830

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        835                 840                 845

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    850                 855                 860

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
865                 870                 875                 880

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                885                 890                 895

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            900                 905                 910

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        915                 920                 925

Pro Gly Lys
    930
```

<210> 58

<211> 2796

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (scFab)-3F2 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 58

```
gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc     180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag     300

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc     360

agcgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac     420

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag     480
```

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gcagcggcgg aggctctgga 660

ggcggctctg aaggcggagg aagtgagggc ggaggctcag aaggcggcgg aagcgaaggt 720

ggcggctctg gcggcggatc cggcgaggtg cagctggtcg agtccggcgg aggcctggtg 780

cagcctggcg gcagcctgag actgagctgc gccgccagcg gctacagctt caccggctac 840

accatgaact gggtccggca ggctcctggc aagggcctcg aatgggtggc cctgatcaac 900

ccctacaagg gcgtgagcac ctacaaccag aagttcaagg accggttcac catcagcgtg 960

gacaagagca agaacaccgc ctatctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1020

gtgtactact gcgccagaag cggctactac ggcgacagcg actggtactt cgacgtgtgg 1080

ggccagggca cactggtcac cgtgtccagc gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc 1140

ctggcccccа gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ccctcggctg cctggtcaag 1200

gactacttcc ccgagccccgt gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg 1260

cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtcacc 1320

gtgccctcca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aataccaagg tggacaagaa ggtggagccc aagagctgcg acggcggtgg tggctccgga 1440

ggaggaggca gcgaggtgca gctgctggaa tctggaggcg gcctggtgca gcctggcggc 1500

agcctgagac tgtcttgcgc cgccagcggc ttcaccttca gcagctacgc catgagctgg 1560

gtccgacagg ctcctggcaa gggactggaa tgggtgtccg ccatctccgg cagcggaggc 1620

agcacctact acgccgacag cgtgaagggc cggttcacca tcagcagaga caacagcaag 1680

aacaccctgt acctgcagat gaacagcctg cgggccgagg ataccgccgt gtattattgc 1740

gccaagggat ggttcggcgg cttcaactac tggggccagg gaaccctggt gacagtgtcc 1800

agcgccagca ccaagggccc ctccgtgttt cctctggccc ccagcagcaa gagcacctct 1860

ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtg aaagactact tccccgagcc cgtgaccgtg 1920

tcctggaact ctggcgccct gaccagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc 1980

agcggcctgt actccctgag cagcgtggtg acagtgccct ccagcagcct gggcacccag 2040

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aagtggacaa gaaggtggaa 2100

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 2160

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 2220

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 2280

```
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac     2340

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc     2400

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccccatcga gaaaaccatc     2460

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atgccgggat     2520

gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac     2580

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc     2640

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     2700

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     2760

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga                               2796
```

<210> 59

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 59

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 60

<211> 1344

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 (VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 60

```
gaggtgcagc tgctggaatc tggaggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg      60
tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgacaggct     120
cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atctccggca gcggaggcag cacctactac     180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acagcaagaa caccctgtac     240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggat accgccgtgt attattgcgc caagggatgg     300
ttcggcggct tcaactactg gggccaggga accctggtga cagtgtccag cgccagcacc     360
aagggccccc ccgtgtttcc tctggccccc agcagcaaga gcacctctgg cggaacagcc     420
gccctgggct gcctggtgaa agactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaactct     480
```

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 540

tccctgagca gcgtggtgac agtgccctcc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaaa gtggacaaga aggtggaacc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtaa atga 1344

<210> 61

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 (VL-CL)

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
                85                  90                  95

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

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

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 62

<211> 648

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 (VL-CL)

<400> 62

```
gagatcgtgc tgacccagtc tcccggcacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc      60

ctgagctgca gagccagcca gagcgtgacc agcagctacc tggcctggta tcagcagaag     120

cccggccagg cccccagact gctgatcaac gtgggcagca gacgggccac cggcatcccc     180

gatagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag ccggctggaa     240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcatca tgctgccccc caccttcggc     300

cagggcacca aggtggaaat caagcggacc gtggccgctc ccagcgtgtt catcttccca     360

cccagcgacg agcagctgaa gtccggcaca gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc     420

taccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc      480

caggaatccg tgaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg     540

accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag     600

ggcctgtcca gccccgtgac caagagcttc aaccggggcg agtgctga                  648
```

<210> 63

<211> 673

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VH-CH1) - V9 (VL-CH1)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 63

```
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 Glu Phe
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

```
Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
225                 230                 235                 240

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
                245                 250                 255

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
            260                 265                 270

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

Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
    290                 295                 300

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

```
Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
                325                 330                 335

Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
            340                 345                 350

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
        355                 360                 365

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
    370                 375                 380

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
385                 390                 395                 400

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
                405                 410                 415

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
            420                 425                 430

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
        435                 440                 445

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
    450                 455                 460

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
465                 470                 475                 480

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                485                 490                 495

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
            500                 505                 510

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
    530                 535                 540
```

```
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
545                 550                 555                 560

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                565                 570                 575

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
            580                 585                 590

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
        595                 600                 605

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
    610                 615                 620

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
625                 630                 635                 640

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                645                 650                 655

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            660                 665                 670

Lys
```

<210> 64

<211> 2022

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VH-CH1) - V9 (VL-CH1)-Fc (botón) P329G LALA

<400> 64

```
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg      60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggcc     120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac     180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accaccgaca ccagcaccag caccgcctac     240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac     300

ttcgcctact atgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct     360
```

agtgctagca caaagggccc cagcgtgttc cctctggccc ctagcagcaa gagcacatct 420

ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact ttcccgagcc cgtgacagtg 480

tcctggaact ctggcgccct gacaagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc 540

agcggcctgt actctctgag cagcgtggtc accgtgccta gctctagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa 660

cccaagagct gcggcggagg cggatccgga ggcggaggat ctgatatcca gatgacccag 720

agccccagca gcctgtctgc cagcgtgggc gacagagtga ccattacctg cagagccagc 780

caggacatca gaaactacct gaactggtat cagcagaagc ccggcaaggc ccccaagctg 840

ctgatctact acaccagcag actggaatcc ggcgtgccca gcagattttc cggcagcggc 900

tctggcaccg actacaccct gacaatcagc agcctgcagc ccgaggactt cgccacctac 960

tactgccagc agggcaacac cctgccctgg acatttggac agggcacaaa ggtggaaatc 1020

aagagcagcg cctccaccaa gggcccttcc gtgtttccac tggcccccag ctctaagagc 1080

accagcggag gaacagctgc tctgggatgt ctcgtgaagg attacttccc cgaacctgtg 1140

accgtcagct ggaacagcgg cgctctgaca tctggggtgc acacattccc cgctgtcctg 1200

cagtcctccg gcctgtacag tctgtccagc gtcgtgacag tgcctagcag ctccctgggg 1260

acacagacat atatctgtaa tgtcaatcac aagcccctcta ataccaaggt cgacaaaaaa 1320

gtcgagccca agtcctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaagct 1380

gctggcggcc cttctgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcagc 1440

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag 1500

ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agacaaagcc gcgggaggag 1560

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1620

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcggcgcccc catcgagaaa 1680

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatgc 1740

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgtggtgcc tggtcaaagg cttctatccc 1800

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1860

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1920

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1980

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 2022

<210> 65

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VH-CH1)-Fc (ojal) P329G LALA

<400> 65

```
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 Glu Phe
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175
```

```
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

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

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

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

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400
```

```
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 66

<211> 1356

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VH-CH1)-Fc (ojal) P329G LALA

<400> 66

```
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg       60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct      120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac      180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac      240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac      300
ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct      360
agcgctagca ccaagggccc ctccgtgttc ccctggcccc ccagcagcaa gagcaccagc      420
ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg      480
tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt      540
tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag      600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag      660
cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg      720
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac      900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      960
```

```
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc     1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat     1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac     1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc     1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga                               1356
```

<210> 67

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VL-CL)

<400> 67

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 68

<211> 648

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VL-CL)

<400> 68

```
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc       60
atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtggtatca gcagaaacca      120
gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc      300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag                   648
```

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 HCDR1

<400> 69

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5 10

<210> 70

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 HCDR1

<400> 70

ggctactcca tcaccagtgg ttattactgg aac 33

<210> 71

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 HCDR2

<400> 71

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 72

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 HCDR2

<400> 72

tacataacct acgacggtag caataactac aacccatctc tcaaaaat 48

<210> 73

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 HCDR3

<400> 73

Phe Asp Tyr
1

<210> 74

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 HCDR3

<400> 74

tttgactac 9

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 VH

<400> 75

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 76

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 VH

<400> 76

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

acctgctctg tcactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac 180

aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240

ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac 300

tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 LCDR1

<400> 77

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 78

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 LCDR1

<400> 78

agtgcaagtc agggcattag aaattattta aac 33

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 LCDR2

<400> 79

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 80

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 LCDR2

<400> 80

tacacatcaa gtttacactc a 21

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 LCDR3

<400> 81

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 82

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 LCDR3

<400> 82

cagcagtata gtaagcttcc ttggacg 27

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 VL

<400> 83

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 84

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007 VL

<400> 84

gatattgtgc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagagacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 HCDR1

<400> 85

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

<210> 86

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 HCDR1

<400> 86

gactacaaga tacac 15

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 HCDR2

<400> 87

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 88

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 HCDR2

<400> 88

tatttcaacc ctaacagcgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 HCDR3

<400> 89

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 90

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 HCDR3

<400> 90

ctatccccag gcggttacta tgttatggat gcc 33

<210> 91

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 VH

<400> 91

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 92

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 VH

<400> 92

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggttt cacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tagtacctac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300

ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 LCDR1

<400> 93

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 94

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 LCDR1

<400> 94

cgggcaagtc agggcattaa caattactta aat 33

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 LCDR2

<400> 95

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

<210> 96

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 LCDR2

<400> 96

aataccaaca acttgcagac a 21

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 LCDR3

<400> 97

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
1 5

<210> 98

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 LCDR3

<400> 98

ttgcagcata atagttttcc cacg 24

<210> 99

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 VL

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

<210> 100

<211> 318

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GA201 VL

<400> 100

```
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc       60

atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca      120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca      180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgcag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc      300

accaagctcg agatcaag                                                    318
```

<210> 101

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 HCDR1

<400> 101

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 102

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 HCDR1

<400> 102

agctacgcca tgagc 15

<210> 103

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 HCDR2

<400> 103

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 104

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 HCDR2

<400> 104

gccatctccg gcagcggagg cagcacctac tacgccgaca gcgtgaag 48

<210> 105

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 HCDR3

<400> 105

Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly
1 5

<210> 106

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 HCDR3

<400> 106

tattgcgcca agggatggtt cggc 24

<210> 107

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 VH

<400> 107

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 108

<211> 351

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 VH

<400> 108

```
gaggtgcagc tgctggaatc tggaggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg       60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgacaggct      120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atctccggca gcggaggcag cacctactac      180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acagcaagaa caccctgtac      240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggat accgccgtgt attattgcgc caagggatgg      300

ttcggcggct tcaactactg gggccaggga accctggtga cagtgtccag c               351
```

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 LCDR1

<400> 109

Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 110

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 LCDR1

<400> 110

agagccagcc agagcgtgac cagcagctac ctg 33

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 LCDR2

<400> 111

Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala
1 5

<210> 112

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 LCDR2

<400> 112

aacgtgggca gcagacgggc c 21

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 LCDR3

<400> 113

Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro
1 5

<210> 114

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 LCDR3

<400> 114

tgccagcagg gcatcatgct gcccccc 27

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 VL

<400> 115

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
            20                  25                  30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
                85                  90                  95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 116

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3F2 VL

<400> 116

```
gagatcgtgc tgacccagtc tcccggcacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc       60

ctgagctgca gagccagcca gagcgtgacc agcagctacc tggcctggta tcagcagaag      120

cccggccagg cccccagact gctgatcaac gtgggcagca gacgggccac cggcatcccc      180

gatagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag ccggctggaa      240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcatca tgctgccccc caccttcggc      300

cagggcacca aggtggaaat caag                                             324
```

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A HCDR1

<400> 117

Glu Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 118

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A HCDR1

<400> 118

gagttcggca tgaac 15

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A HCDR2

<400> 119

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 120

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A HCDR2

<400> 120

tggatcaaca ccaagaccgg cgaggccacc tacgtggaag agttcaaggg c 51

<210> 121

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A HCDR3

<400> 121

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 122

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A HCDR3

<400> 122

tgggacttcg cctattacgt ggaagccatg gactac 36

<210> 123

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A VH

<400> 123

```
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 Glu Phe
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 124

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A VH

<400> 124

```
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg       60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct      120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac      180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac      240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac      300

ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct      360

agc                                                                    363
```

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A LCDR1

<400> 125

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 126

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A LCDR1

<400> 126

aaggccagtg cggctgtggg tacgtatgtt gcg 33

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A LCDR2

<400> 127

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

<210> 128

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A LCDR2

<400> 128

tcggcatcct accgcaaaag g 21

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A LCDR3

<400> 129

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 130

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A LCDR3

<400> 130

caccaatatt acacctatcc tctattcacg 30

<210> 131

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A VL

<400> 131

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 132

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A VL

<400> 132

gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caag 324

<210> 133

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 HCDR1

<400> 133

Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser Asn Ile His
1 5 10

<210> 134

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 HCDR1

<400> 134

ggctacacca tcaccgacag caacatccac 30

<210> 135

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 HCDR2

<400> 135

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Gln
1 5 10

<210> 136

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 HCDR2

<400> 136

tacatctacc cctacaacgg cggcaccgac tacaaccag 39

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 HCDR3

<400> 137

Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr
1 5

<210> 138

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 HCDR3

<400> 138

ggcaacccct ggctggccta t 21

<210> 139

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 VH

<400> 139

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

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

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

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

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 140

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 VH

<400> 140

```
gaagtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg       60

tcctgcaagg ccagcggcta caccatcacc gacagcaaca tccactgggt ccgacaggcc      120

cctgggcaga gcctggaatg gatcggctac atctaccccc acaacggcgg caccgactac      180

aaccagaagt tcaagaaccg ggccaccctg accgtggaca accccaccaa caccgcctac      240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccttct actactgcgt gaacggcaac      300

ccctggctgg cctattgggg ccagggaacc ctggtcaccg tgtctagc                  348
```

<210> 141

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 LCDR1

<400> 141

Arg Ala Ser Glu Ser Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr
1 5 10 15

<210> 142

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 LCDR1

<400> 142

cgggccagcg agagcctgga caactacggc atccggtttc tgacc 45

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 LCDR2

<400> 143

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 144

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 LCDR2

<400> 144

gccgccagca accagggcag c 21

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 LCDR3

<400> 145

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser
1 5

<210> 146

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 LCDR3

<400> 146

cagcagacca aagaggtgcc ctggtcc 27

<210> 147

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 VL

<400> 147

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

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

Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

```
Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
            100                 105                 110
```

<210> 148

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 VL

<400> 148

```
gacatccagc tgacccagag ccccagcacc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcga gagcctggac aactacggca tccggtttct gacctggttc     120
cagcagaagc ccggcaaggc ccccaagctg ctgatgtacg ccgccagcaa ccagggcagc     180
ggcgtgccaa gcagattcag cggcagcggc tccggcaccg agttcaccct gaccatcagc     240
agcctgcagc ccgacgactt cgccacctac tactgccagc agaccaaaga ggtgccctgg     300
tccttcggcc agggcaccaa ggtggaagtg aag                                  333
```

<210> 149

<211> 227

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 149

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 150

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

<400> 150

```
Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 151

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

<400> 151

```
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1               5                   10                  15
```

<210> 152

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

<400> 152

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            20                  25                  30
```

<210> 153

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

<400> 153

```
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
1               5                   10                  15

Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
            20                  25                  30

Ser Gly
```

<210> 154

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 1

<400> 154

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 155

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 1

<400> 155

atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 156

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 1

<400> 156

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 157

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 2

<400> 157

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 158

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 2

<400> 158

atggacatga gggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 159

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 3

<400> 159

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 160

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 3

<400> 160

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc 57

<210> 161

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 3

<400> 161

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc 57

<210> 162

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Líder 3

<400> 162

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct 57

<210> 163

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 HCDR1

<400> 163

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 164

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 HCDR1

<400> 164

ggctacacca tgaac 15

<210> 165

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 HCDR2

<400> 165

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 166

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 HCDR2

<400> 166

ctgatcaacc cctacaaggg cgtgagcacc tacaaccaga agttcaagga c 51

<210> 167

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 HCDR3

<400> 167

Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 168

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 HCDR3

<400> 168

agcggctact acggcgacag cgactggtac ttcgacgtg 39

<210> 169

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 VH

<400> 169

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 170

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 VH

<400> 170

gaggtgcagc tggtcgagtc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

agctgcgccg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt ccggcaggct 120

cctggcaagg gcctcgaatg ggtggccctg atcaacccct acaagggcgt gagcacctac 180

aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agcgtggaca agagcaagaa caccgcctat 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcggc 300

tactacggcg acagcgactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcacact ggtcaccgtg 360

tccagc 366

<210> 171

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 LCDR1

<400> 171

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 172

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 LCDR1

<400> 172

cgggccagcc aggacatcag aaactacctg aac 33

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 LCDR2

<400> 173

Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 174

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 LCDR2

<400> 174

tacacctcta gactggaaag c 21

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 LCDR3

<400> 175

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 176

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 LCDR3

<400> 176

cagcagggca acacactccc ctggacc 27

<210> 177

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 VL

<400> 177

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

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

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

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

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

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

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

<210> 178

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 VL

<400> 178

```
gacatccaga tgacccagag cccctctagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc       60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc      120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctctagac tggaaagcgg cgtgcccagc      180
```

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggcaacacac tcccctggac cttcggccag 300

ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 179

<211> 454

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VH-CL)-LC007 (VL-CL)

<400> 179

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

```
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
    130                 135                 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
145                 150                 155                 160

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225                 230                 235                 240

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
                245                 250                 255

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
            260                 265                 270

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
        275                 280                 285

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    290                 295                 300

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
305                 310                 315                 320

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
                325                 330                 335

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            340                 345                 350

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        355                 360                 365
```

```
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    370                 375                 380

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
385                 390                 395                 400

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                405                 410                 415

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            420                 425                 430

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        435                 440                 445

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    450
```

<210> 180

<211> 1362

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VH-CL)-LC007(VL-CL)

<400> 180

```
gaggtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg       60
agctgtgccg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt gcgccaggcc      120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccctg atcaacccct acaagggcgt gtccacctac      180
aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agcgtggaca agagcaagaa caccgcctac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaagcggc      300
tactacggcg acagcgactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcacact cgtgaccgtg      360
tcaagcgcta gcgtggccgc tcccagcgtg ttcatcttcc cacctagcga cgagcagctg      420
aagtccggca cagcctctgt cgtgtgcctg ctgaacaact tctaccccg cgaggccaag       480
gtgcagtgga aggtggacaa tgccctgcag agcggcaaca gccaggaaag cgtgaccgag      540
caggacagca aggatagcac ctacagcctg agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac      600
tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa gtgacccacc agggcctgtc tagccccgtg      660
```

accaagagct tcaaccgggg cgagtgtgat ggcggaggcg gatccggggg aggcggctct 720

gatattgtgc tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcct ctctgggcga cagagtgacc 780

atcagctgta gcgcctctca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagcggccc 840

gacggcaccg tgaagctgct gatctactac accagctccc tgcactccgg cgtgcccagc 900

agattttctg gcagcggctc cggcaccgac tactccctga ccatctccaa cctggaaccc 960

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tactccaagc tgccctggac ctttggaggc 1020

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gctgccccct ccgtgtttat ctttccccca 1080

tccgatgaac agctgaaaag cggcaccgcc agcgtcgtgt gtctgctgaa caatttttac 1140

cctagggaag ctaaagtgca gtggaaagtg gataacgcac tgcagtccgg caactcccag 1200

gaatctgtga cagaacagga ctctaaggac agcacatact ccctgtcctc caccctgaca 1260

ctgtctaagg ctgattatga gaaacacaaa gtgtatgctt gtgaagtgac acatcaggga 1320

ctgagcagcc ctgtgacaaa gtccttcaac agaggcgagt gc 1362

<210> 181

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc(botón) P329G LALA

<400> 181

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

```
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 182

<211> 681

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc(botón) P329G LALA

<400> 182

```
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc      60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca     120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac     180
```

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat gccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 183

<211> 212

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VL-CH1)

<400> 183

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145                 150                 155                 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
            180                 185                 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
        195                 200                 205

Pro Lys Ser Cys
    210
```

<210> 184

<211> 636

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9 (VL-CH1)

<400> 184

```
gatattcaga tgacccagag ccccagctct ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tggaaagcgg cgtgccctcc     180

agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240

gaggatttcg ccacatatta ctgccagcag ggcaataccc tgccctggac cttcggacag     300

ggcacaaaag tggaaatcaa gagcagcgct tccaccaaag gcccttccgt gtttcctctg     360

gctcctagct ccaagtccac ctctggaggc accgctgctc tcggatgcct cgtgaaggat     420

tattttcctg agcctgtgac agtgtcctgg aatagcggag cactgacctc tggagtgcat     480
```

actttccccg ctgtgctgca gtcctctgga ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgacagtg 540

cccagcagca gcctgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac 600

accaaggtgg acaagaaggt ggaacccaag tcttgt 636

<210> 185

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 185

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
130 135 140

```
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
145                 150                 155                 160

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                245                 250                 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
            260                 265                 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
        275                 280                 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    290                 295                 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305                 310                 315                 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
                325                 330                 335

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
            340                 345                 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
        355                 360                 365
```

```
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    370                 375                 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385                 390                 395                 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            420                 425                 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 186

<211> 1368

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 186

```
gaggtgcagc tggtcgagag cggaggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg       60
agctgcgccg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt ccggcaggca      120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccctg atcaacccct acaagggcgt gagcacctac      180
aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agcgtggaca agagcaagaa caccgcctat      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcggc      300
tactacggcg acagcgactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccct cgtgaccgtg      360
tctagcgcta gcgtggccgc tccctccgtg tttatctttc ccccatccga tgaacagctg      420
aaaagcggca ccgcctccgt cgtgtgtctg ctgaacaatt tttaccctag ggaagctaaa      480
gtgcagtgga aagtggataa cgcactgcag tccggcaact cccaggaatc tgtgacagaa      540
caggactcca aggacagcac ctactccctg tcctccaccc tgacactgtc taaggctgat      600
```

```
tatgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc      660
acaaagagct tcaacagggg agagtgtgac aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc      720
cctgaagctg ctggcggccc ttctgtgttc ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg      780
atgatcagcc ggaccccgga agtgacctgc gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct      840
gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gacaaagccg      900
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag      960
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc     1020
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg     1080
cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc     1140
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac     1200
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc     1260
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct     1320
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa                  1368
```

<210> 187

<211> 682

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007(VH-CH1)-V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 187

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

```
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
```

```
        195                 200                 205

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

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

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
                245                 250                 255

Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
            260                 265                 270

Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln
        275                 280                 285

Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr
    290                 295                 300

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp
                325                 330                 335

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala
            340                 345                 350

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
        355                 360                 365

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
    370                 375                 380

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
385                 390                 395                 400

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                405                 410                 415

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
            420                 425                 430

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
        435                 440                 445

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    450                 455                 460
```

```
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
465                 470                 475                 480

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                485                 490                 495

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            500                 505                 510

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        515                 520                 525

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    530                 535                 540

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
545                 550                 555                 560

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                565                 570                 575

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
            580                 585                 590

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        595                 600                 605

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    610                 615                 620

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
625                 630                 635                 640

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                645                 650                 655

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            660                 665                 670

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        675                 680
```

<210> 188

<211> 2046

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007(VH-CH1) - V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 188

gaggtgcagc tgcaggaatc tggccctggc ctggtcaagc caagccagag tctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcta cagcattacc agcggctact actggaactg gattcggcag 120

ttccccggca ataagctgga atggatgggc tacatcacct acgacggcag caacaactac 180

aaccccagcc tgaagaaccg gatcagcatc acccgggaca ccagcaagaa ccagttcttc 240

ctgaagctga acagcgtgac caccgaggac accgccacat actattgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccac cctgaccgtg tccagcgcca gcacaaaggg ccctagcgtg 360

ttccctctgg cccccagcag caagagcaca agcggcggaa cagccgccct gggctgcctc 420

gtgaaggact acttccccga gcccgtgaca gtgtcttgga acagcggagc cctgacaagc 480

ggcgtgcaca ccttccctgc cgtgctgcag agcagcggcc tgtactccct gagcagcgtg 540

gtcaccgtgc ctagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600

cccagcaaca ccaaagtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgtgatgg cggaggaggg 660

tccggaggcg gaggatccga agtgcagctg gtggaatctg gcggaggcct ggtgcagcct 720

ggcggatctc tgagactgag ctgtgccgcc agcggctaca gcttcaccgg ctacaccatg 780

aactgggtgc gccaggcccc tggcaaggga ctggaatggg tggccctgat caacccctac 840

aagggcgtgt ccacatacaa ccagaagttc aaggaccggt tcaccatcag cgtggacaag 900

agcaagaaca ccgcctacct gcagatgaac agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac 960

tattgtgcca gaagcggcta ctacggcgac agcgactggt acttcgacgt gtggggccag 1020

ggcacactcg tgaccgtgtc aagcgctagc gtggccgctc cctccgtgtt tatctttccc 1080

ccatccgatg aacagctgaa aagcggcacc gcctccgtcg tgtgtctgct gaacaatttt 1140

taccctaggg aagctaaagt gcagtggaaa gtggataacg cactgcagtc cggcaactcc 1200

caggaatctg tgacagaaca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 1260

acactgtcta aggctgatta tgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 1320

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtgacaa gacccacacc 1380

tgtccccctt gtcctgcccc tgaagctgct ggcggccctt ctgtgttcct gttccccccа 1440

aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggat 1500

gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 1560

aacgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1620

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1680

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1740

ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1800

tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1860

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1920

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1980

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2040

ggtaaa 2046

<210> 189

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 (VL-CL)

<400> 189

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 190

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 (VL-CL)

<400> 190

```
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc       60

atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc      120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc      180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccattagctc cctgcagccc      240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacagcaagc tgccctggac cttcggccag      300

ggaacaaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca      360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                         642
```

<210> 191

<211> 664

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VL-CH1)-M4-3 ML2(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 191

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
            100                 105                 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145                 150                 155                 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
            180                 185                 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
        195                 200                 205

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
    210                 215                 220
```

```
Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
225                 230                 235                 240

Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr
                245                 250                 255

Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
            260                 265                 270

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
        275                 280                 285

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
    290                 295                 300

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asp
305                 310                 315                 320

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
                325                 330                 335

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
            340                 345                 350

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
    370                 375                 380

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
385                 390                 395                 400

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
            420                 425                 430

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
        435                 440                 445

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    450                 455                 460
```

```
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
465                 470                 475                 480

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                485                 490                 495

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
            500                 505                 510

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        515                 520                 525

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    530                 535                 540

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
545                 550                 555                 560

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
                565                 570                 575

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            580                 585                 590

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        595                 600                 605

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
    610                 615                 620

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
625                 630                 635                 640

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                645                 650                 655

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            660
```

<210> 192

<211> 1992

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VL-CH1)-M4-3 ML2(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA (DNA)

<400> 192

gatatccaga tgacccagag ccccagctct ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tggaaagcgg cgtgccctcc 180

agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggatttcg ccacatatta ctgccagcag ggcaataccc tgccctggac cttcggacag 300

ggcacaaaag tggaaatcaa gagcagcgct tccaccaaag gcccttccgt gtttcctctg 360

gctcctagct ccaagtccac ctctggaggc accgctgctc tcggatgcct cgtgaaggat 420

tattttcctg agcctgtgac agtgtcctgg aatagcggag cactgacctc tggagtgcat 480

actttccccg ctgtgctgca gtcctctgga ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgacagtg 540

cccagcagca gcctgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac 600

accaaggtgg acaagaaggt ggaacccaag tcttgtggcg gaggcggatc cggcggaggg 660

ggatctcagg tgcagctgca ggaaagcggc cctggcctgg tcaagcccag ccagaccctg 720

agcctgacct gcaccgtgtc cggcggcagc atcaccagcg gctactactg gaactggatt 780

cggcagcacc ccggcaaggg cctggaatgg atcggctaca tcacctacga cggcagcaac 840

aactacaacc ccagcctgaa gtccagagtg accatcagcc gggacaccag caagaaccag 900

ttcagcctga agctgtccag cgtgacagcc gccgacaccg ccgtgtacta ctgcgccgac 960

ttcgactact ggggccaggg caccctggtc accgtgtcca gcgctagcac caagggcccc 1020

agcgtgttcc ccctggcacc cagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cgctctgggc 1080

tgtctggtga aagactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cttggaactc tggcgccctg 1140

accagcggcg tgcacacctt tccagccgtg ctgcagagca gcggcctgta ctccctgtcc 1200

tccgtggtca ccgtgccctc tagctccctg ggaacacaga catatatctg taatgtcaat 1260

cacaagcctt ccaacaccaa agtcgataag aaagtcgagc ccaagagctg cgacaaaact 1320

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 1380

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1440

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1500

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1560

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1620

tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1680

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1740

agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1800

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1860

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1920

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1980

tctccgggta aa 1992

<210> 193

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 193

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
            180                 185                 190

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

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

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

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

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                325                 330                 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
            340                 345                 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    370                 375                 380

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

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                405                 410                 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            420                 425                 430
```

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 194

<211> 1326

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 194

caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctact actggaactg gatccggcag 120

caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcacct acgacggcag caacaactac 180

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240

ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgcta gcaccaaggg cccctccgtg 360

ttccccctgg ccccagcag caagagcacc agcggcggca cagccgctct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga gcccgtgacc gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc 480

ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag agttctggcc tgtatagcct gagcagcgtg 540

gtcaccgtgc cttctagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgcgacaa aactcacaca 660

tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 720

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 780

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020

ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc 1080

tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1200

ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320

ggtaaa 1326

<210> 195

<211> 681

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VH-CL)-M4-3 ML2(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 195

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
    130                 135                 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
145                 150                 155                 160

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
                165                 170                 175
```

```
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
225                 230                 235                 240

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

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
            260                 265                 270

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        275                 280                 285

Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    290                 295                 300

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
305                 310                 315                 320

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                325                 330                 335

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

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
        355                 360                 365

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
    370                 375                 380

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
385                 390                 395                 400
```

```
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
                405                 410                 415

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
            420                 425                 430
```

```
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
        435                 440                 445

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
    450                 455                 460

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
465                 470                 475                 480

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
                485                 490                 495

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
            500                 505                 510

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
        515                 520                 525

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
    530                 535                 540

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
545                 550                 555                 560

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
                565                 570                 575

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
            580                 585                 590

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
        595                 600                 605

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
    610                 615                 620

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
625                 630                 635                 640

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
                645                 650                 655

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
```

660 665 670

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680

<210> 196

<211> 2043

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VH-CL)-M4-3 ML2(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA (DNA)

<400> 196

gaggtgcagc tggtcgagag cggaggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

agctgcgccg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt ccggcaggca 120

cctggcaagg gactggaatg ggtggccctg atcaacccct acaagggcgt gagcacctac 180

aaccagaagt tcaaggaccg gttcaccatc agcgtggaca agagcaagaa caccgcctat 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaagcggc 300

tactacggcg acagcgactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccct cgtgaccgtg 360

tctagcgcta gcgtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg 420

aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 480

gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag 540

caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac 600

tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc 660

acaaagagct tcaacagggg agagtgtggc ggaggcggat ccggcggagg gggatctcag 720

gtgcagctgc aggaaagcgg ccctggcctg gtcaagccca gccagaccct gagcctgacc 780

tgcaccgtgt ccggcggcag catcaccagc ggctactact ggaactggat tcggcagcac 840

cccggcaagg gcctggaatg gatcggctac atcacctacg acggcagcaa caactacaac 900

cccagcctga agtccagagt gaccatcagc cgggacacca gcaagaacca gttcagcctg 960

aagctgtcca gcgtgacagc cgccgacacc gccgtgtact actgcgccga cttcgactac 1020

tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc agcgctagca ccaagggccc cagcgtgttc 1080

cccctggcac ccagcagcaa gagcacatct ggcggaacag ccgctctggg ctgtctggtg 1140

aaagactact tccccgagcc cgtgaccgtg tcttggaact ctggcgccct gaccagcggc 1200

gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc agcggcctgt actccctgtc ctccgtggtc 1260

accgtgccct ctagctccct gggaacacag acatatatct gtaatgtcaa tcacaagcct 1320

tccaacacca aagtcgataa gaaagtcgag cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc 1380

ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa 1440

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 1500

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat 1560

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 1620

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1680

gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1740

caggtgtaca ccctgccccc atgccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg 1800

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1860

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1920

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1980

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 2040

aaa 2043

<210> 197

<211> 690

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A(VH-CH1)-V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 197

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 Glu Phe
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

```
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg
            260                 265                 270

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr
        275                 280                 285

Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile
    290                 295                 300

Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
305                 310                 315                 320

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
        355                 360                 365

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

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
385                 390                 395                 400

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
                405                 410                 415

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
            420                 425                 430

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
        435                 440                 445

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
    450                 455                 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
465                 470                 475                 480

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                485                 490                 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            500                 505                 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        515                 520                 525

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    530                 535                 540

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                565                 570                 575
```

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
580 585 590

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
595 600 605

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
610 615 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625 630 635 640

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
660 665 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
675 680 685

Gly Lys
690

<210> 198

<211> 2070

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A(VH-CH1)-V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 198

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggcc 120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttcgcctact atgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agtgctagca caaagggccc cagcgtgttc cctctggccc ctagcagcaa gagcacatct 420

ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact ttcccgagcc cgtgacagtg 480

tcctggaact ctggcgccct gacaagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc 540

agcggcctgt actctctgag cagcgtggtc accgtgccta gctctagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa 660

cccaagagct gcggcggagg cggatccgga ggcggaggat ccgaagtgca gctggtggaa 720

tctggcggag gcctggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

tacagcttca ccggctacac catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa gggactggaa 840

tgggtggccc tgatcaaccc ctacaagggc gtgtccacat acaaccagaa gttcaaggac 900

cggttcacca tcagcgtgga caagagcaag aacaccgcct acctgcagat gaacagcctg 960

cgggccgagg acaccgccgt gtactattgt gccagaagcg gctactacgg cgacagcgac 1020

tggtacttcg acgtgtgggg ccagggcaca ctcgtgaccg tgtcaagcgc tagcgtggcc 1080

gctccctccg tgtttatctt tcccccatcc gatgaacagc tgaaaagcgg caccgcctcc 1140

gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttttaccct agggaagcta aagtgcagtg gaaagtggat 1200

aacgcactgc agtccggcaa ctcccaggaa tctgtgacag aacaggactc caaggacagc 1260

acctactccc tgtcctccac cctgacactg tctaaggctg attatgagaa acacaaagtc 1320

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1380

ggagagtgtg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 1440

ccttctgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 1500

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1560

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1620

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1680

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1740

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1800

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1860

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1920

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1980

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2040

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2070

<210> 199

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H2C (VL-CH1)

<400> 199

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
        35                  40                  45

Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
    50                  55                  60

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

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85                  90                  95

Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
            100                 105                 110

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

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210
```

<210> 200

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H2C (VL-CH1)

<400> 200

cagaccgtgg tgacacagga acccagcctg accgtctccc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acctgtggaa gcagcacagg cgccgtgacc agcggctact accccaactg ggtgcagcag 120

aagcccggcc aggcccctag aggactgatc ggcggcacca agtttctggc ccctggcacc 180

cccgccagat tctctggctc tctgctgggc ggcaaggccg ccctgacact gtctggcgtg 240

cagcctgagg acgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacag atgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac cgtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360

cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480

gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540

acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 201

<211> 684

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H2C (VH-CL)-M4-3 ML2(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 201

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
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 Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
            100                 105                 110

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

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

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

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

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
            180                 185                 190

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
                245                 250                 255

Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu
        275                 280                 285

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro
    290                 295                 300

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

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
                325                 330                 335

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
        355                 360                 365

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    370                 375                 380

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
385                 390                 395                 400

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
                405                 410                 415

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
            420                 425                 430

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        435                 440                 445

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    450                 455                 460

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
465                 470                 475                 480

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                485                 490                 495
```

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
500 505 510

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
515 520 525

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
530 535 540

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
545 550 555 560

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
565 570 575

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
580 585 590

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
595 600 605

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
610 615 620

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
625 630 635 640

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
645 650 655

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
660 665 670

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680

<210> 202

<211> 2052

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H2C (VH-CL)-M4-3 ML2 (VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 202

```
gaggtgcagc tggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggaag cctgaagctg      60
tcttgcgccg ccagcggctt caccttcaac aaatacgcca tgaactgggt gcgccaggcc     120
cctggcaagg gactggaatg ggtggcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc     180
tactacgccg acagcgtgaa ggaccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc     240
gcctacctgc agatgaacaa cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgtgcgg     300
cacggcaact tcggcaacag ctacatcagc tactgggcct actggggaca gggcaccctg     360
gtgacagtgt ccagcgctag cgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat     420
gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga     480
```

gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 540

gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 600

aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgtggcg gaggcggatc cggcggaggg 720

ggatctcagg tgcagctgca ggaaagcggc cctggcctgg tcaagcccag ccagaccctg 780

agcctgacct gcaccgtgtc cggcggcagc atcaccagcg gctactactg gaactggatt 840

cggcagcacc ccggcaaggg cctggaatgg atcggctaca tcacctacga cggcagcaac 900

aactacaacc ccagcctgaa gtccagagtg accatcagcc gggacaccag caagaaccag 960

ttcagcctga agctgtccag cgtgacagcc gccgacaccg ccgtgtacta ctgcgccgac 1020

ttcgactact ggggccaggg caccctggtc accgtgtcca gcgctagcac caagggcccc 1080

agcgtgttcc ccctggcacc cagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cgctctgggc 1140

tgtctggtga aagactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cttggaactc tggcgccctg 1200

accagcggcg tgcacacctt ccagccgtg ctgcagagca gcggcctgta ctccctgtcc 1260

tccgtggtca ccgtgccctc tagctccctg ggaacacaga catatatctg taatgtcaat 1320

cacaagcctt ccaacaccaa agtcgataag aaagtcgagc ccaagagctg cgacaaaact 1380

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 1440

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1500

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1560

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1620

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1680

tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1740

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1800

agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1860

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1920

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1980

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 2040

tctccgggta aa 2052

<210> 203

<211> 212

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 431/26 (VL-CL)

<400> 203

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
            100                 105                 110

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

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

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

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
                165                 170                 175

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
            180                 185                 190

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
        195                 200                 205

Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 204

<211> 636

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 431/26 (VL-CL)

<400> 204

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gcaccagcag cagcgtgtcc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 120

aaggccccca agctgctgat ctacagcacc tccaatctgg ccagcggcgt gcccagcaga 180

ttttctggca gcggctccgg caccgacttc accttcacca tcagctccct gcagcccgag 240

gatatcgcca cctactactg ccaccagtgg tccagctacc ccacctttgg ccagggcacc 300

aaggtggaaa tcaagcgtac ggtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat 360

gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 420

gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 480

gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 540

aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 600

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgt 636

<210> 205

<211> 689

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 431/26(VH-CH1)-V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 205

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

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

Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

```
Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln
            260                 265                 270

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys
        275                 280                 285

Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
    290                 295                 300
```

```
Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305                 310                 315                 320

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
        355                 360                 365

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
    370                 375                 380

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
385                 390                 395                 400

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
                405                 410                 415

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
            420                 425                 430

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
        435                 440                 445

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540
```

```
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                565                 570                 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            580                 585                 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        595                 600                 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    610                 615                 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625                 630                 635                 640

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            660                 665                 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        675                 680                 685

Lys
```

<210> 206

<211> 2067

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 431/26(VH-CH1)-V9(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 206

```
caggtgcagc tgcaggaatc tggccctgga ctcgtgcggc ctagccagac actgagcctg       60

acctgtaccg tgtccggctt caccatcagc agcggctaca gctggcattg ggtgcgccag      120

ccacctggca gaggcctgga atggatcggc tacatccagt acagcggcat caccaactac      180

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatg ctggtggaca cctccaagaa ccagttcagc      240
```

ctgcggctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgcgc cagagaggac 300

tacgactacc actggtactt cgacgtgtgg ggccagggct ctctcgtgac cgtgtcaagc 360

gctagcacaa agggccccag cgtgttccct ctggccccta gcagcaagag cacatctggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactactttc ccgagcccgt gacagtgtcc 480

tggaactctg gcgccctgac aagcggcgtg cacacctttc cagccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ctctgagcag cgtggtcacc gtgcctagct ctagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc 660

aagagctgcg gcggaggcgg atccggaggc ggaggatccg aagtgcagct ggtggaatct 720

ggcggaggcc tggtgcagcc tggcggatct ctgagactga gctgtgccgc cagcggctac 780

agcttcaccg gctacaccat gaactgggtg cgccaggccc ctggcaaggg actggaatgg 840

gtggccctga tcaaccccta caagggcgtg tccacataca accagaagtt caaggaccgg 900

ttcaccatca gcgtggacaa gagcaagaac accgcctacc tgcagatgaa cagcctgcgg 960

gccgaggaca ccgccgtgta ctattgtgcc agaagcggct actacggcga cagcgactgg 1020

tacttcgacg tgtggggcca gggcacactc gtgaccgtgt caagcgctag cgtggccgct 1080

ccctccgtgt ttatctttcc cccatccgat gaacagctga aaagcggcac cgcctccgtc 1140

gtgtgtctgc tgaacaattt ttaccctagg gaagctaaag tgcagtggaa agtggataac 1200

gcactgcagt ccggcaactc ccaggaatct gtgacagaac aggactccaa ggacagcacc 1260

tactccctgt cctccaccct gacactgtct aaggctgatt atgagaaaca caaagtctac 1320

gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga 1380

gagtgtgaca agacccacac ctgtcccccc tgtcctgccc ctgaagctgc tggcggccct 1440

tctgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgaa 1500

gtgacctgcg tggtggtgga tgtgtcccac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac 1560

gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 207

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 431/26(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 207

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

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

Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Ile Gly Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

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

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
            340                 345                 350

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

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

Gly Lys
450

<210> 208

<211> 1350

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 431/26(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 208

caggtgcagc tgcaggaatc tggccctgga ctcgtgcggc ctagccagac actgagcctg 60

acctgtaccg tgtccggctt caccatcagc agcggctaca gctggcattg ggtgcgccag 120

ccacctggca gaggcctgga atggatcggc tacatccagt acagcggcat caccaactac 180

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatg ctggtggaca cctccaagaa ccagttcagc 240

ctgcggctga gcagcgtgac agccgccgat acagccgtgt actactgcgc cagagaggac 300

tacgactacc actggtactt cgacgtgtgg ggccagggct ctctcgtgac cgtgtcaagc 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 209

<211> 464

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VL-CL)-V9 (VH-CL)

<400> 209

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
            180                 185                 190
```

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    210                 215                 220

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

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

Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val
            260                 265                 270

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

Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr
    290                 295                 300

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
        355                 360                 365

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
    370                 375                 380
```

```
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
385                 390                 395                 400

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
                405                 410                 415

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
            420                 425                 430

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
        435                 440                 445

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    450                 455                 460
```

<210> 210

<211> 1392

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A (VL-CL)-V9 (VH-CL)

<400> 210

gatatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacatgca aggcctctgc cgccgtgggc acatacgtgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggaagagagg cgtgcccagc 180

agattttccg gcagcggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccaccag tactacacct acccccctgtt caccttcggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg gtggccgctc ccagcgtgtt catcttccca 360

cctagcgacg agcagctgaa gtccggcaca gcctctgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420

taccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaatg ccctgcagag cggcaacagc 480

caggaaagcg tgaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg 540

acactgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag 600

ggcctgtcta gccccgtgac caagagcttc aaccggggcg aatgtggcgg cggaggatcc 660

ggcggaggcg gctccggagg cggaggaagt ggcggagggg gatctgaagt gcagctggtg 720

gaatctggcg gaggcctggt gcagcctggc ggatctctga gactgagctg tgccgccagc 780

ggctacagct tcaccggcta caccatgaac tgggtgcgcc aggcccctgg caagggactg 840

gaatgggtgg ccctgatcaa cccctacaag ggcgtgtcca catacaacca gaagttcaag 900

gaccggttca ccatcagcgt ggacaagagc aagaacaccg cctacctgca gatgaacagc 960

ctgcgggccg aggacaccgc cgtgtactac tgtgccagaa gcggctacta cggcgacagc 1020

gactggtact tcgacgtgtg gggccaggga accctcgtga ccgtgtcaag cgctagcgtg 1080

gccgcaccct ctgtgtttat ctttccaccc tctgacgaac agctgaaaag cggcaccgcc 1140

agcgtcgtgt gtctgctgaa caatttttac cctagggaag ctaaagtgca gtggaaagtg 1200

gataacgcac tgcagtccgg caactcccag gaatctgtga cagaacagga ctccaaggac 1260

agcacatact ccctgtccag cacactgacc ctgtctaagg ccgattatga gaaacacaaa 1320

gtgtatgctt gtgaagtgac acatcaggga ctgagcagcc ctgtgacaaa gtccttcaac 1380

agaggcgagt gt 1392

<210> 211

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 211

```
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 Glu Phe
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175
```

```
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430
```

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 212

<211> 1353

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH1A1A(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 212

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agcgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atgccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 213

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc(ojal) P329G LALA

<400> 213

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 214

<211> 681

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc(ojal) P329G LALA

<400> 214

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 215

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH2527 (VL-CH1)

<400> 215

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 216

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH2527 (VL-CH1)

<400> 216

caggccgtcg tgacccagga aagcgccctg acaacaagcc ctggcgagac agtgaccctg 60

acctgcagat ctagcacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccgacc acctgttcac cggcctgatc ggcggcacca acaaaagggc tccaggcgtg 180

ccagccagat tcagcggcag cctgattggc gataaggccg ccctgaccat cactggcgcc 240

cagacagagg acgaggccat ctacttttgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360

cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480

gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540

acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 217

<211> 684

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH2527(VH-CL)-LC007(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 217

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Tyr
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 Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
            100                 105                 110

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

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

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

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

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
            180                 185                 190

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

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

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
            260                 265                 270

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
        275                 280                 285

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro
    290                 295                 300

Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
305                 310                 315                 320
```

```
Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
                325                 330                 335

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
        355                 360                 365

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    370                 375                 380

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
385                 390                 395                 400

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
                405                 410                 415

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
            420                 425                 430

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        435                 440                 445

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

    450                 455                 460

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
465                 470                 475                 480

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                485                 490                 495

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            500                 505                 510

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
        515                 520                 525

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
    530                 535                 540

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
545                 550                 555                 560
```

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
565 570 575

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
580 585 590

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
595 600 605

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
610 615 620

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
625 630 635 640

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
645 650 655

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
660 665 670

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680

<210> 218

<211> 2052

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CH2527(VH-CL)-LC007(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 218

gaagtgcagc tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctaagggctc tctgaagctg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcaac acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtggcccgg atcagaagca agtacaacaa ttacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa ggaccggttc accatcagcc gggacgacag ccagagcatc 240

ctgtacctgc agatgaacaa cctgaaaacc gaggacaccg ccatgtacta ctgcgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgacagtgt ctgctgctag cgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat 420

gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 480

gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 540

gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 600

aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgtggcg gaggcggatc cggcggaggg 720

ggatctgagg tccagctgca ggagtcagga cctggcctcg tgaaaccttc tcagtctctg 780

tctctcacct gctctgtcac tggctactcc atcaccagtg gttattactg gaactggatt 840

cggcagtttc caggaaacaa gctggaatgg atgggctaca taacctacga cggtagcaat 900

aactacaacc catctctcaa aaatcgaatc tccattactc gtgacacatc taagaaccag 960

tttttcctga agttgaattc tgtgactact gaggacacag ctacatatta ctgtgcggac 1020

tttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctcca gcgctagcac caagggcccc 1080

agcgtgttcc ccctggcacc cagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cgctctgggc 1140

tgtctggtga aagactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cttggaactc tggcgccctg 1200

accagcggcg tgcacacctt ccagccgtg ctgcagagca gcggcctgta ctccctgtcc 1260

tccgtggtca ccgtgccctc tagctccctg ggaacacaga catatatctg taatgtcaat 1320

cacaagcctt ccaacaccaa agtcgataag aaagtcgagc ccaagagctg cgacaaaact 1380

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 1440

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1500

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1560

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1620

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1680

tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1740

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1800

agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1860

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1920

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1980

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 2040

tctccgggta aa 2052

<210> 219

<211> 685

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007(VH-CH1)-CH2527(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 219

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

```
Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
                245                 250                 255

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
            260                 265                 270

Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
        275                 280                 285

Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln
    290                 295                 300

Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
305                 310                 315                 320

Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
                325                 330                 335

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

Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        355                 360                 365

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
385                 390                 395                 400

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                405                 410                 415

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            420                 425                 430

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        435                 440                 445
```

```
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    450                 455                 460

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
465                 470                 475                 480

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                485                 490                 495

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            500                 505                 510

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        515                 520                 525

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    530                 535                 540

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
545                 550                 555                 560

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                565                 570                 575

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
            580                 585                 590

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
        595                 600                 605

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    610                 615                 620

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
625                 630                 635                 640

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                645                 650                 655

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            660                 665                 670

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        675                 680                 685
```

<210> 220

<211> 2055

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC007(VH-CH1)-CH2527(VH-CL)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 220

gaggtgcagc tgcaggaatc tggccctggc ctggtcaagc caagccagag tctgagcctg 60

acctgcagcg tgaccggcta cagcattacc agcggctact actggaactg gattcggcag 120

ttccccggca ataagctgga atggatgggc tacatcacct acgacggcag caacaactac 180

aaccccagcc tgaagaaccg gatcagcatc acccgggaca ccagcaagaa ccagttcttc 240

ctgaagctga acagcgtgac caccgaggac accgccacat actattgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccac cctgaccgtg tccagcgcca gcacaaaggg ccctagcgtg 360

ttccctctgg cccccagcag caagagcaca agcggcggaa cagccgccct gggctgcctc 420

gtgaaggact acttccccga gcccgtgaca gtgtcttgga acagcggagc cctgacaagc 480

ggcgtgcaca ccttccctgc cgtgctgcag agcagcggcc tgtactccct gagcagcgtg 540

gtcaccgtgc ctagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600

cccagcaaca ccaaagtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgtgatgg cggaggaggg 660

tccggaggcg gaggatccga agtgcagctg gtggaaagcg gcggaggcct ggtgcagcct 720

aagggctctc tgaagctgag ctgtgccgcc agcggcttca ccttcaacac ctacgccatg 780

aactgggtgc gccaggcccc tggcaaaggc ctggaatggg tggcccggat cagaagcaag 840

tacaacaatt acgccaccta ctacgccgac agcgtgaagg accggttcac catcagccgg 900

gacgacagcc agagcatcct gtacctgcag atgaacaacc tgaaaaccga ggacaccgcc 960

atgtactact gcgtgcggca cggcaacttc ggcaacagct atgtgtcttg gtttgcctac 1020

tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct gctgctagcg tggccgctcc ctccgtgttt 1080

atctttcccc catccgatga acagctgaaa agcggcaccg cctccgtcgt gtgtctgctg 1140

aacaattttt accctaggga agctaaagtg cagtggaaag tggataacgc actgcagtcc 1200

ggcaactccc aggaatctgt gacagaacag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 1260

tccaccctga cactgtctaa ggctgattat gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 1320

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgacaag 1380

acccacacct gtccccctg tcctgcccct gaagctgctg gcggcccttc tgtgttcctg 1440

ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atcagccgga cccccgaagt gacctgcgtg 1500

gtggtggatg tgtcccacga ggaccctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 1560

gaagtgcaca acgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1620

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1680

gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1740

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1800

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1860

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1920

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1980

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 2040

ctgtctccgg gtaaa 2055

<210> 221

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 (VL-CL)

<400> 221

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
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 Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
```

<210> 222

<211> 654

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33 (VL-CL)

<400> 222

```
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc       60
atcacctgtc gggccagcga gagcgtggac aactacggca tcagcttcat gaactggttc      120
cagcagaagc ccggcaaggc ccccaagctg ctgatctacg ccgccagcaa tcagggcagc      180
ggcgtgccca gcagattcag cggctctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc      240
agcctgcagc ccgacgactt cgccacctac tactgccagc agagcaaaga ggtgccctgg      300
accttcggcc agggcaccaa ggtggaaatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc      360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg      480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      540
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc      600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt             654
```

<210> 223

<211> 668

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VL-CH1)-anti-CD33((VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 223

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
            100                 105                 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145                 150                 155                 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
            180                 185                 190
```

```
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
        195                 200                 205

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
    210                 215                 220

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val
225                 230                 235                 240

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met
                245                 250                 255

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
            260                 265                 270

Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser
        275                 280                 285

Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu
    290                 295                 300

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
305                 310                 315                 320

Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
                325                 330                 335

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
            340                 345                 350

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
        355                 360                 365

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
    370                 375                 380

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
385                 390                 395                 400

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
                405                 410                 415
```

```
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
            420                 425                 430

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
        435                 440                 445

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
    450                 455                 460

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
465                 470                 475                 480

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
                485                 490                 495

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
            500                 505                 510

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
        515                 520                 525

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
    530                 535                 540

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
545                 550                 555                 560

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
                565                 570                 575

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
            580                 585                 590

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
        595                 600                 605

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
    610                 615                 620

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
625                 630                 635                 640
```

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
645 650 655

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
660 665

<210> 224

<211> 2004

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VL-CH1)-anti-CD33(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 224

gatatccaga tgacccagag ccccagctct ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tggaaagcgg cgtgccctcc 180

agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggatttcg ccacatatta ctgccagcag ggcaataccc tgccctggac cttcggacag 300

ggcacaaaag tggaaatcaa gagcagcgct tccaccaaag gcccttccgt gtttcctctg 360

gctcctagct ccaagtccac ctctggaggc accgctgctc tcggatgcct cgtgaaggat 420

tattttcctg agcctgtgac agtgtcctgg aatagcggag cactgacctc tggagtgcat 480

actttccccg ctgtgctgca gtcctctgga ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgacagtg 540

cccagcagca gcctgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac 600

accaaggtgg acaagaaggt ggaacccaag tcttgtggcg gaggcggatc cggcggaggc 660

ggatctcagg tgcagctggt gcagtctggc gccgaagtga agaaacccgg cagcagcgtg 720

aaggtgtcct gcaaggccag cggctacacc ttcaccgact acaacatgca ctgggtccgc 780

caggccccag gccagggact ggaatggatc ggctacatct acccctacaa cggcggcacc 840

ggctacaacc agaagttcaa gagcaaggcc accatcaccg ccgacgagag caccaacacc 900

gcctacatgg aactgagcag cctgcggagc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccaga 960

ggcagacccg ccatggacta ctggggccag ggcaccctgg tgacagtgtc cagcgccagc 1020

acaaagggcc ccagcgtgtt ccccctggca cccagcagca agagcacatc tggcggaaca 1080

gccgctctgg gctgtctggt gaaagactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 1140

tctggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 1200

tactccctgt cctccgtggt caccgtgccc tctagctccc tgggaacaca gacatatatc 1260

tgtaatgtca atcacaagcc ttccaacacc aaagtcgata agaaagtcga gcccaagagc 1320

tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 1380

gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 1440

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 1500

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 1560

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1620

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1680

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1740

aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1800

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1860

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1920

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1980

agcctctccc tgtctccggg taaa 2004

<210> 225

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 225

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

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

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

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

```
Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn 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 Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 226

<211> 1338

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD33(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 226

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacaaca tgcactgggt ccgccaggcc 120

ccaggccagg gactggaatg gatcggctac atctaccccc acaacggcgg caccggctac 180

aaccagaagt tcaagagcaa ggccaccatc accgccgacg agagcaccaa caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcaga 300

cccgccatgg actactgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtccagcgc tagcaccaag 360

ggcccctccg tgttcccccc ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga 480

gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc 540

ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080

caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200

ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320

tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 227

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD20 (VL-CL)

<400> 227

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 228

<211> 657

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD20 (VL-CL)

<400> 228

```
gatatcgtga tgacccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gcccgccagc       60

attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg gcatcactta tttgtattgg      120

tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctcctgattt atcaaatgtc caaccttgtc      180

tctggcgtcc ctgaccggtt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc      240

agcagggtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgcg ctcagaatct agaacttcct      300

tacaccttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgta cggtggctgc accatctgtc      360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa      600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt         657
```

<210> 229

<211> 671

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VL-CH1)-anti-CD20(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 229

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

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

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

```
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
            100                 105                 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145                 150                 155                 160

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
            180                 185                 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
        195                 200                 205

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
    210                 215                 220

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val
225                 230                 235                 240

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Ile
                245                 250                 255

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
            260                 265                 270
```

```
Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly
        275                 280                 285

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
    290                 295                 300

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
305                 310                 315                 320

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                325                 330                 335

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
            340                 345                 350

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
        355                 360                 365

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
    370                 375                 380

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
385                 390                 395                 400

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
                405                 410                 415

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
            420                 425                 430

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
        435                 440                 445

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
    450                 455                 460

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
465                 470                 475                 480

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
                485                 490                 495
```

```
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
            500                 505                 510

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
    530                 535                 540

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
545                 550                 555                 560

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
                565                 570                 575

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
            580                 585                 590

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
        595                 600                 605

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
    610                 615                 620

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
625                 630                 635                 640

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
                645                 650                 655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            660                 665                 670
```

<210> 230

<211> 2013

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> V9(VL-CH1)-anti-CD20(VH-CH1)-Fc(botón) P329G LALA

<400> 230

```
gatatccaga tgacccagag ccccagctct ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc      60
atcacctgtc gggccagcca ggacatcaga aactacctga actggtatca gcagaagccc     120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tggaaagcgg cgtgccctcc     180
agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc     240
gaggatttcg ccacatatta ctgccagcag ggcaataccc tgccctggac cttcggacag     300
ggcacaaaag tggaaatcaa gagcagcgct tccaccaaag gcccttccgt gtttcctctg     360
gctcctagct ccaagtccac ctctggaggc accgctgctc tcggatgcct cgtgaaggat     420
tattttcctg agcctgtgac agtgtcctgg aatagcggag cactgacctc tggagtgcat     480
actttccccg ctgtgctgca gtcctctgga ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgacagtg     540

cccagcagca gcctgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac     600
accaaggtgg acaagaaggt ggaacccaag tcttgtggcg gaggcggatc cggcggaggg     660
ggatctcagg tgcaattggt gcagtctggc gctgaagtta agaagcctgg gagttcagtg     720
aaggtctcct gcaaggcttc cggatacgcc ttcagctatt cttggatcaa ttgggtgcgg     780
caggcgcctg gacaagggct cgagtggatg ggacggatct ttcccggcga tggggatact     840
gactacaatg ggaaattcaa gggcagagtc acaattaccg ccgacaaatc cactagcaca     900
gcctatatgg agctgagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaaga     960
aatgtctttg atggttactg gcttgtttac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc    1020
tcagctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggcac ccagcagcaa gagcacatct    1080
ggcggaacag ccgctctggg ctgtctggtg aaagactact tccccgagcc cgtgaccgtg    1140
tcttggaact ctggcgccct gaccagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc    1200
agcggcctgt actccctgtc ctccgtggtc accgtgccct ctagctccct gggaacacag    1260
acatatatct gtaatgtcaa tcacaagcct tccaacacca aagtcgataa gaaagtcgag    1320
cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg    1380
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc    1440
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac    1500
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac    1560
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc    1620
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc    1680
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atgccgggat    1740
gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac    1800
```

```
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc     1860

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1920

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1980

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa                                  2013
```

<210> 231

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD20(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 231

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

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

```
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
            340                 345                 350

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 232

<211> 1347

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD20(VH-CH1)-Fc(ojal) P329G LALA

<400> 232

```
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tcaattgggt gcggcaggcg     120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac     180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat     240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc     300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagct     360
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc     420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg     480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga     540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac     600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa     660
```

```
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg      720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag      780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg     1080
accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag     1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag     1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa                                        1347
```

<210> 233

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 HCDR1

<400> 233

```
Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1               5                   10
```

<210> 234

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 HCDR1

<400> 234

```
ggcggcagca tcaccagcgg ctactactgg aac                                 33
```

<210> 235

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 HCDR2

<400> 235

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 236

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 HCDR2

<400> 236

tacatcacct acgacggcag caacaactac aaccccagcc tgaagtcc 48

<210> 237

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 HCDR3

<400> 237

Phe Asp Tyr
1

<210> 238

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 HCDR3

<400> 238

ttcgactac 9

<210> 239

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 VH

<400> 239

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

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

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 240

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 VH

<400> 240

```
caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg      60

acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctact actggaactg gatccggcag     120

caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcacct acgacggcag caacaactac     180
```

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240

ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagc 336

<210> 241

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 LCDR1

<400> 241

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 242

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 LCDR1

<400> 242

cgggccagcc agggcatccg gaactacctg aac 33

<210> 243

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 LCDR2

<400> 243

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 244

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 LCDR2

<400> 244

tacaccagca gcctgcacag c 21

<210> 245

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 LCDR3

<400> 245

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 246

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 LCDR3

<400> 246

cagcagtaca gcaagctgcc ctggacc 27

<210> 247

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 VL

<400> 247

<220>

<223> M4-3 ML2 VL

<400> 247

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 248

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4-3 ML2 VL

<400> 248

```
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc       60

atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc      120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc      180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccattagctc cctgcagccc      240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacagcaagc tgccctggac cttcggccag      300

ggaacaaagg tggagatcaa g                                                321
```

<210> 249

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anti-CD3 HCDR1

<400> 249

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 250

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 HCDR1

<400> 250

acctacgcca tgaac

<210> 251

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 HCDR2

<400> 251

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 252

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 HCDR2

<400> 252

cggatcagaa gcaagtacaa caattacgcc acctactacg ccgacagcgt gaaggac 57

<210> 253

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 HCDR3

<400> 253

```
His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1               5                   10
```

<210> 254

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 HCDR3

<400> 254

```
cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct ac                    42
```

<210> 255

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 VH

<400> 255

```
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser 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 Tyr
            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 Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50                  55                  60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
            100                 105                 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
        115                 120                 125
```

<210> 256

<211> 375

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 VH

<400> 256

```
gaagtgcagc tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctaagggctc tctgaagctg      60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcaac acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc     120
cctggcaaag gcctggaatg ggtggcccgg atcagaagca agtacaacaa ttacgccacc     180
tactacgccg acagcgtgaa ggaccggttc accatcagcc gggacgacag ccagagcatc     240
ctgtacctgc agatgaacaa cctgaaaacc gaggacaccg ccatgtacta ctgcgtgcgg     300
cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc     360
gtgacagtgt ctgct                                                     375
```

<210> 257

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 LCDR1

<400> 257

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 258

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 LCDR1

<400> 258

agatctagca caggcgccgt gaccaccagc aactacgcca ac 42

<210> 259

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 LCDR2

<400> 259

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 260

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 LCDR2

<400> 260

ggcaccaaca aaagggctcc a 21

<210> 261

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 LCDR3

<400> 261

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 262

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 LCDR3

<400> 262

gccctgtggt acagcaacct gtgggtg 27

<210> 263

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 VL

<400> 263

```
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
            20                  25                  30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
        35                  40                  45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65                  70                  75                  80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85                  90                  95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105
```

<210> 264

<211> 327

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD3 VL

<400> 264

```
caggccgtcg tgacccagga aagcgccctg acaacaagcc ctggcgagac agtgaccctg       60

acctgcagat ctagcacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa      120

aagcccgacc acctgttcac cggcctgatc ggcggcacca acaaaagggc tccaggcgtg      180

ccagccagat tcagcggcag cctgattggc gataaggccg ccctgaccat cactggcgcc      240

cagacagagg acgaggccat ctacttttgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc      300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctg                                          327
```

<210> 265

<211> 207

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 265

```
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1               5                  10                  15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
            20                  25                  30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
        35                  40                  45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
    50                  55                  60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65                  70                  75                  80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
                85                  90                  95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
            100                 105                 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
        115                 120                 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
                165                 170                 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
            180                 185                 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
        195                 200                 205
```

<210> 266

<211> 198

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 266

```
Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1               5                  10                  15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
        35                  40                  45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
    50                  55                  60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
                85                  90                  95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
            100                 105                 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
        115                 120                 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
    130                 135                 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145                 150                 155                 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
                165                 170                 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
            180                 185                 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
        195
```

REIVINDICACIONES

1. Una molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, siendo uno de ellos una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T y siendo el otro de ellos una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de crear una asociación estable;

en la que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab entrecruzada en la que las regiones variables o constantes de la cadena ligera Fab y la cadena pesada Fab están intercambiadas;

en la que el primer y el segundo resto de unión a antígeno están fusionados entre sí, opcionalmente a través de conector peptídico; y

en la que la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T comprende no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de linfocitos T.

2. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la reivindicación 1, en la que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que, opcionalmente

i) la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno están fusionadas entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico; y/o

ii) el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

3. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la reivindicación 1, en la que el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno, en la que, opcionalmente

i) la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera Fab del segundo resto de unión a antígeno están fusionadas entre sí, opcionalmente a través de un conector peptídico; y/o

ii) en la que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

4. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la reivindicación 1, en la que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena ligera Fab al extremo N de la cadena ligera Fab del primer resto de unión a antígeno, y en la que, opcionalmente, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

5. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, en la que, opcionalmente, el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc, y en la que, opcionalmente

i) el segundo y el tercer resto de unión a antígeno están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del segundo resto de unión a antígeno; o

ii) el primer y el tercer resto de unión a antígeno están fusionados cada uno en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C de la cadena pesada Fab al extremo N de la cadena pesada Fab del primer resto de unión a antígeno.

6. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que

i) la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T es como se define en la reivindicación 5(i) y en la que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, particularmente una inmunoglobulina de clase IgG;

ii) el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, específicamente de IgG_1 o IgG_4;

iii) el dominio Fc es un dominio Fc humano; y/o

iv) el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc, en el que, opcionalmente, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una volumen de la cadena lateral mayor, generando así una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que se puede colocar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando así una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que se puede colocar la protuberancia del dominio CH3 de la primera subunidad.

7. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que

i) el dominio Fc exhibe una afinidad de unión reducida por un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG1 natural;

ii) el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora;

iii) el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc y/o la función efectora, en el que dicha una o más sustituciones de aminoácidos está en una o más posiciones seleccionadas entre el grupo de L234, L235 y P329 (numeración UE); y/o

iv) cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc activador y/o la función efectora, en las que dichas sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y P329G (numeración UE).

8. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de la reivindicación 7, en la que

i) el receptor Fc es un receptor Fcγ; o

ii) la función efectora es citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

9. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que

i) el antígeno activador de linfocitos T es CD3; y/o

ii) el antígeno de la célula diana se selecciona entre el grupo que consiste en: proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD19, CD20, CD33, antígeno carcinoembrionario (CEA) y proteína de activación de fibroblastos (FAP).

10. Un polinucleótido aislado que codifica la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un procedimiento de producción de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las etapas de a) cultivo de una célula hospedadora que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 10, o un vector que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 10, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T y b) recuperación de la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T.

12. Una composición farmacéutica que comprende la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. La molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12

i) para su uso como medicamento;

ii) para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite;

iii) para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite, en el que la enfermedad es cáncer; o

iv) para su uso en un procedimiento de inducción de la lisis de una célula diana en un individuo, que comprende poner en contacto una célula diana con la molécula biespecífica de unión a antígeno activadora de linfocitos T en presencia de un linfocito T, en el que la célula diana es una célula tumoral.

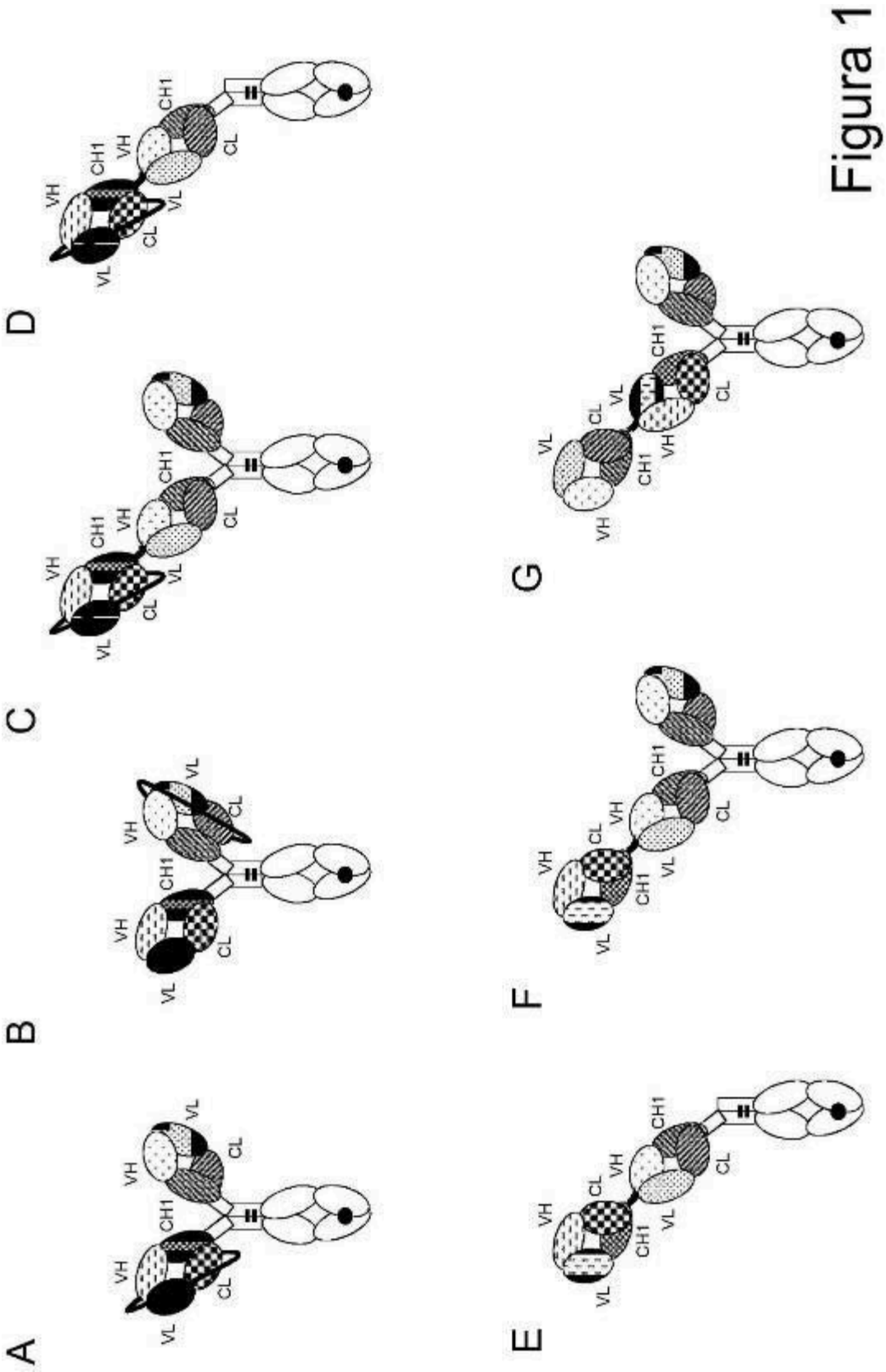
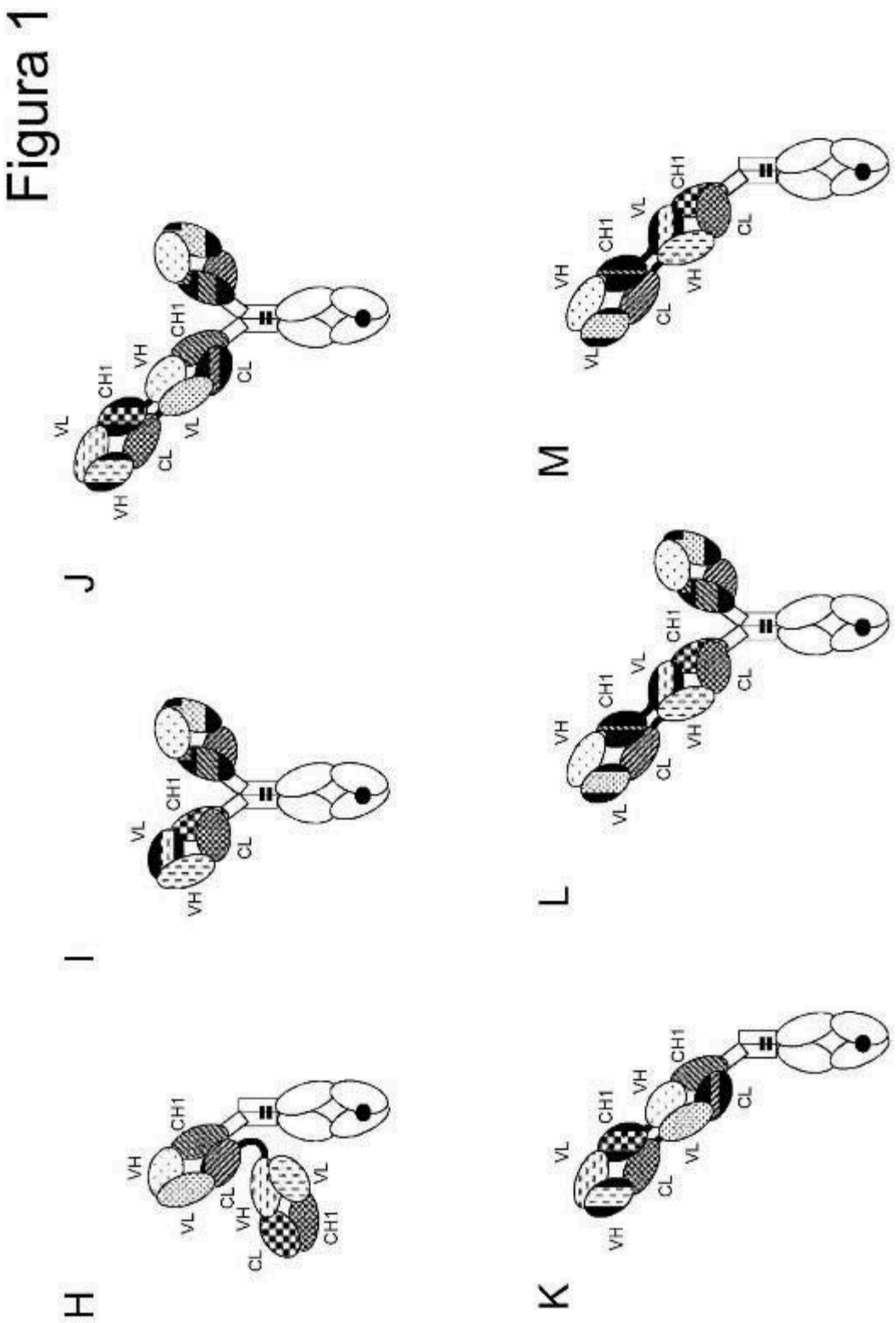


Figura 1

Figura 1



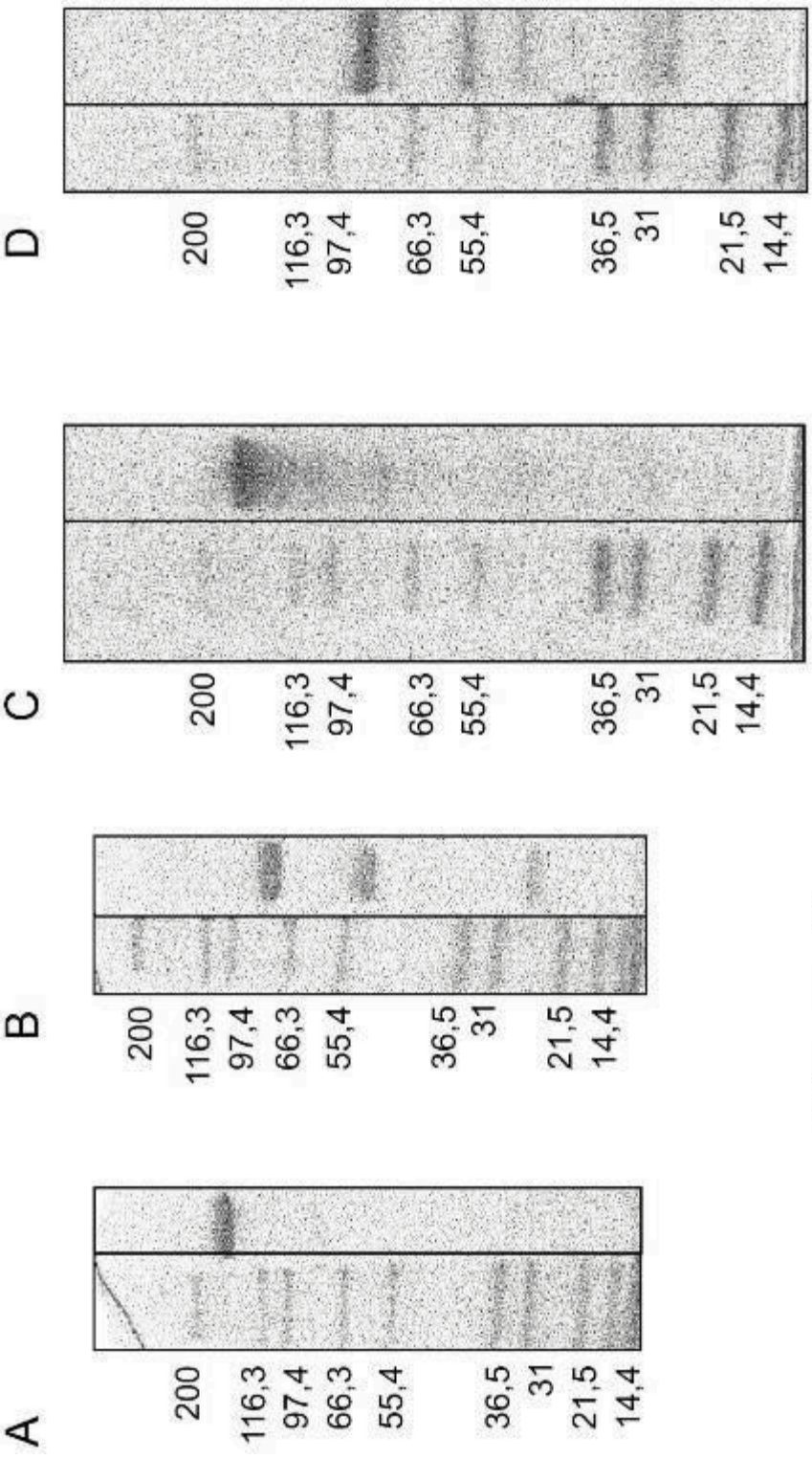
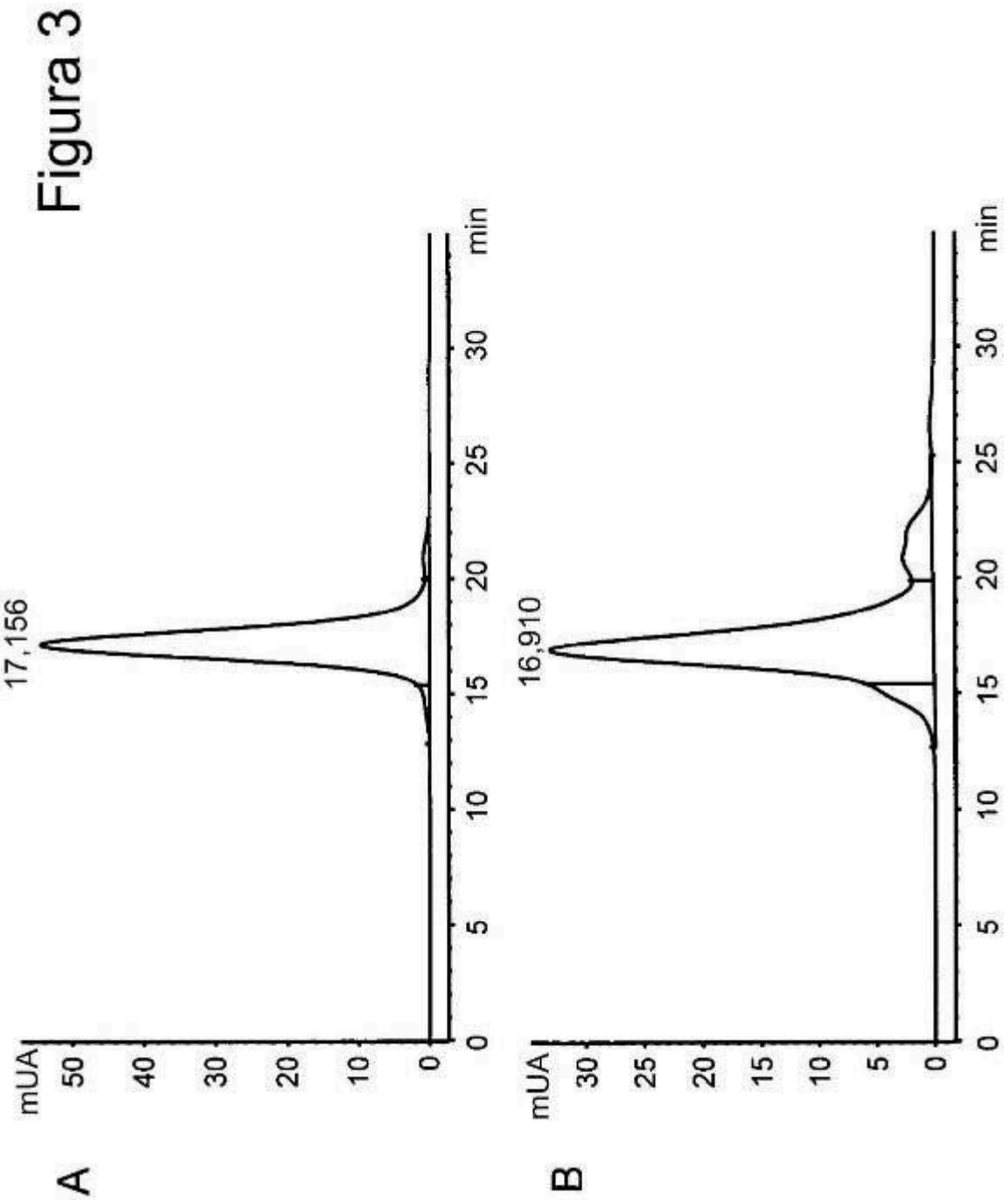


Figura 2

Figura 3


A
mUA
50
40
30
20
10
0
17,156
0
5
10
15
20
25
30
min
B
mUA
30
25
20
15
10
5
0
16,910
0
5
10
15
20
25
30
min

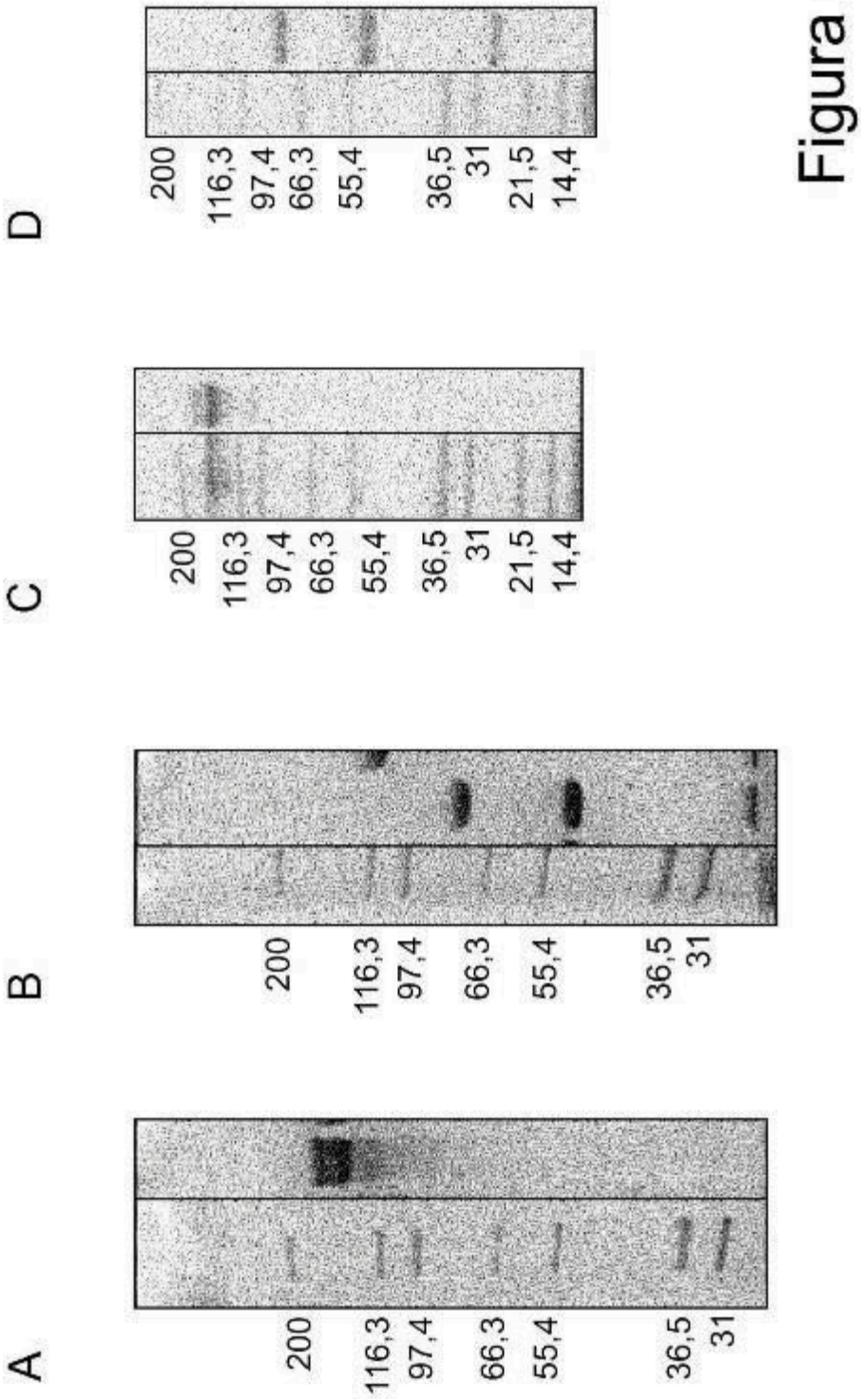

A
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
B
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
C
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
D
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4

Figura 4

Figura 5

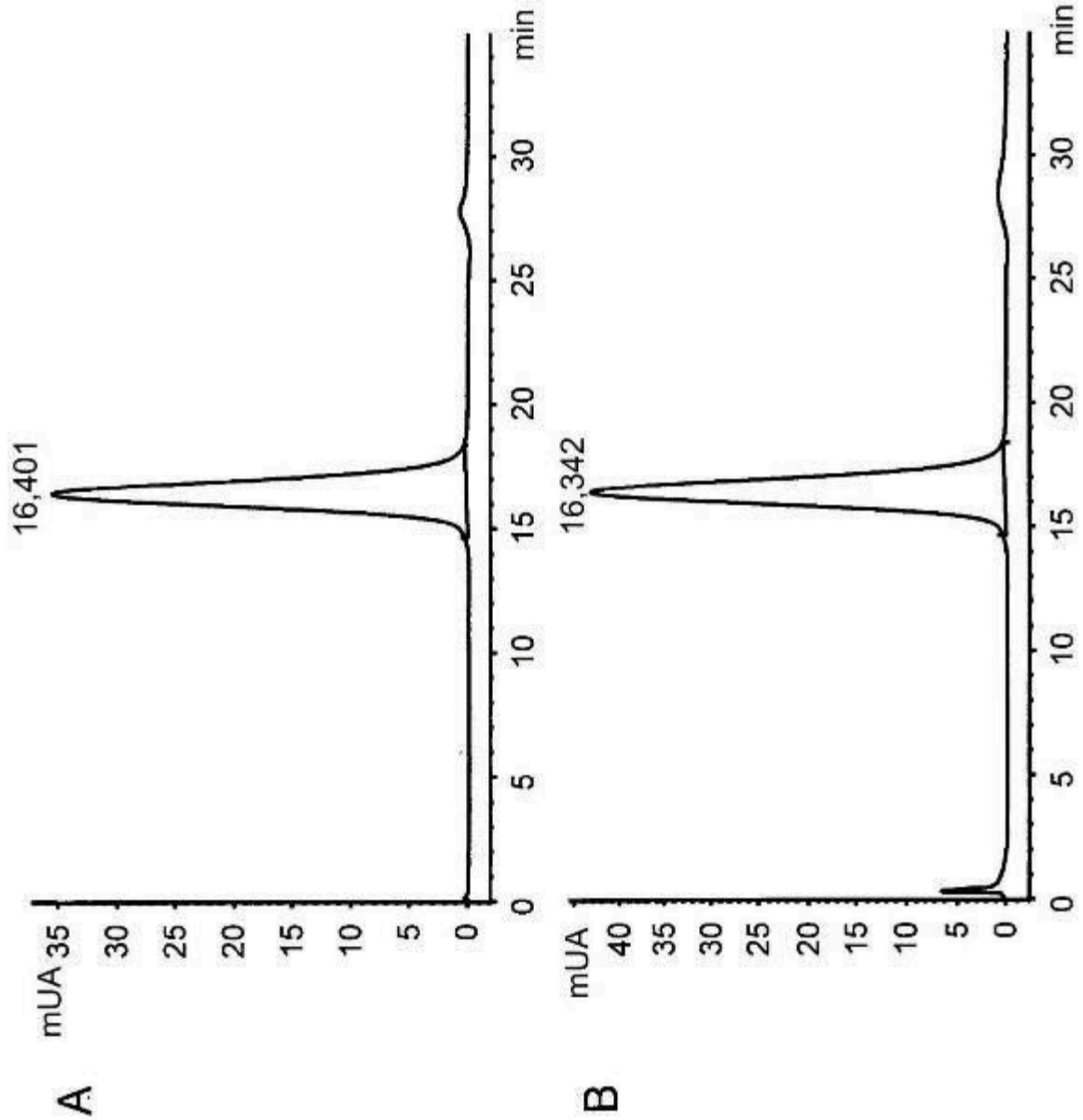
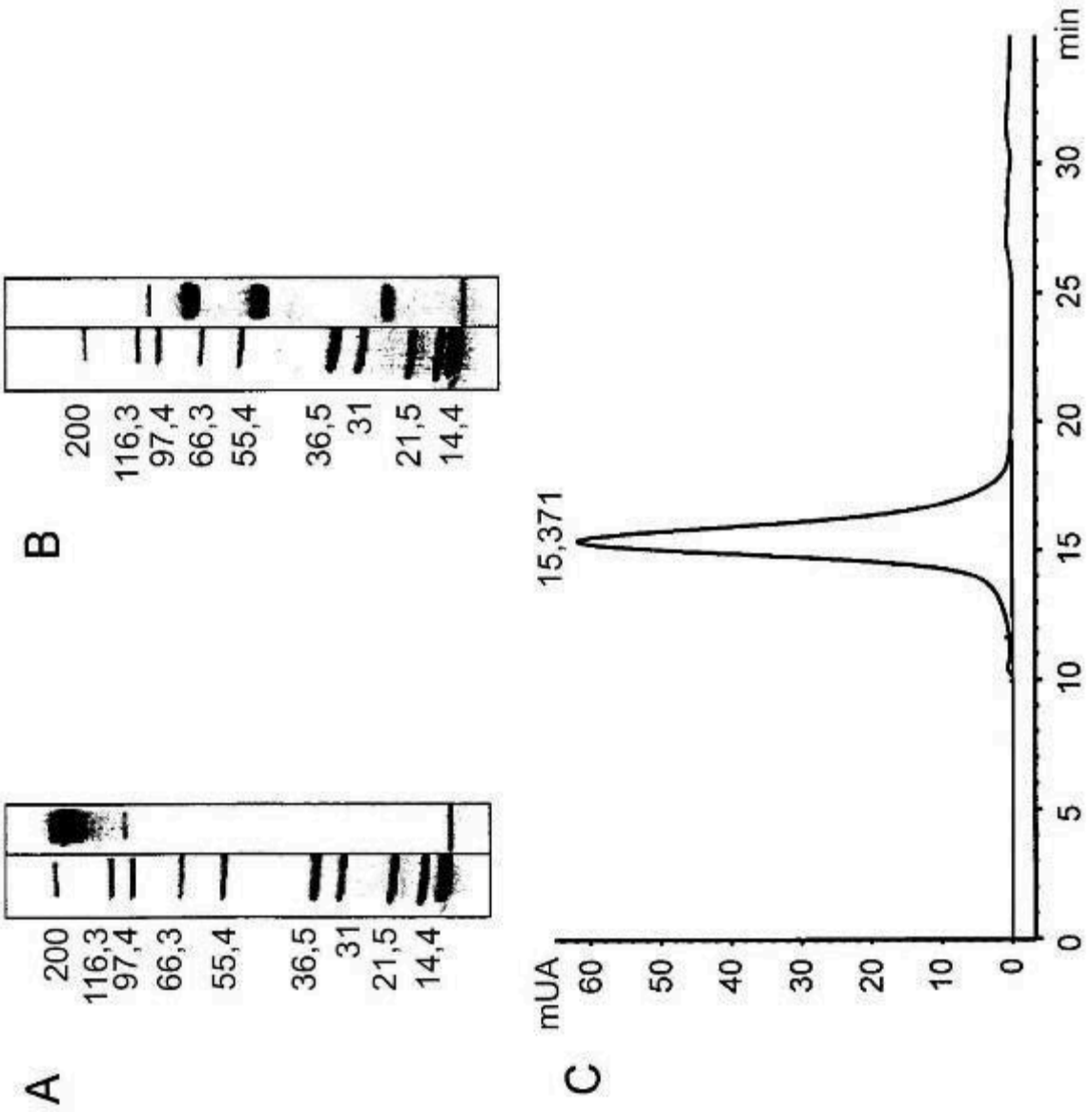

A
mUA
35
30
25
20
15
10
5
0
16,401
0
5
10
15
20
25
30
min
B
mUA
40
35
30
25
20
15
10
5
0
16,342
0
5
10
15
20
25
30
min

Figura 6


A
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
B
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
mUA
60
50
40
30
20
10
0
15,371
0
5
10
15
20
25
30
min

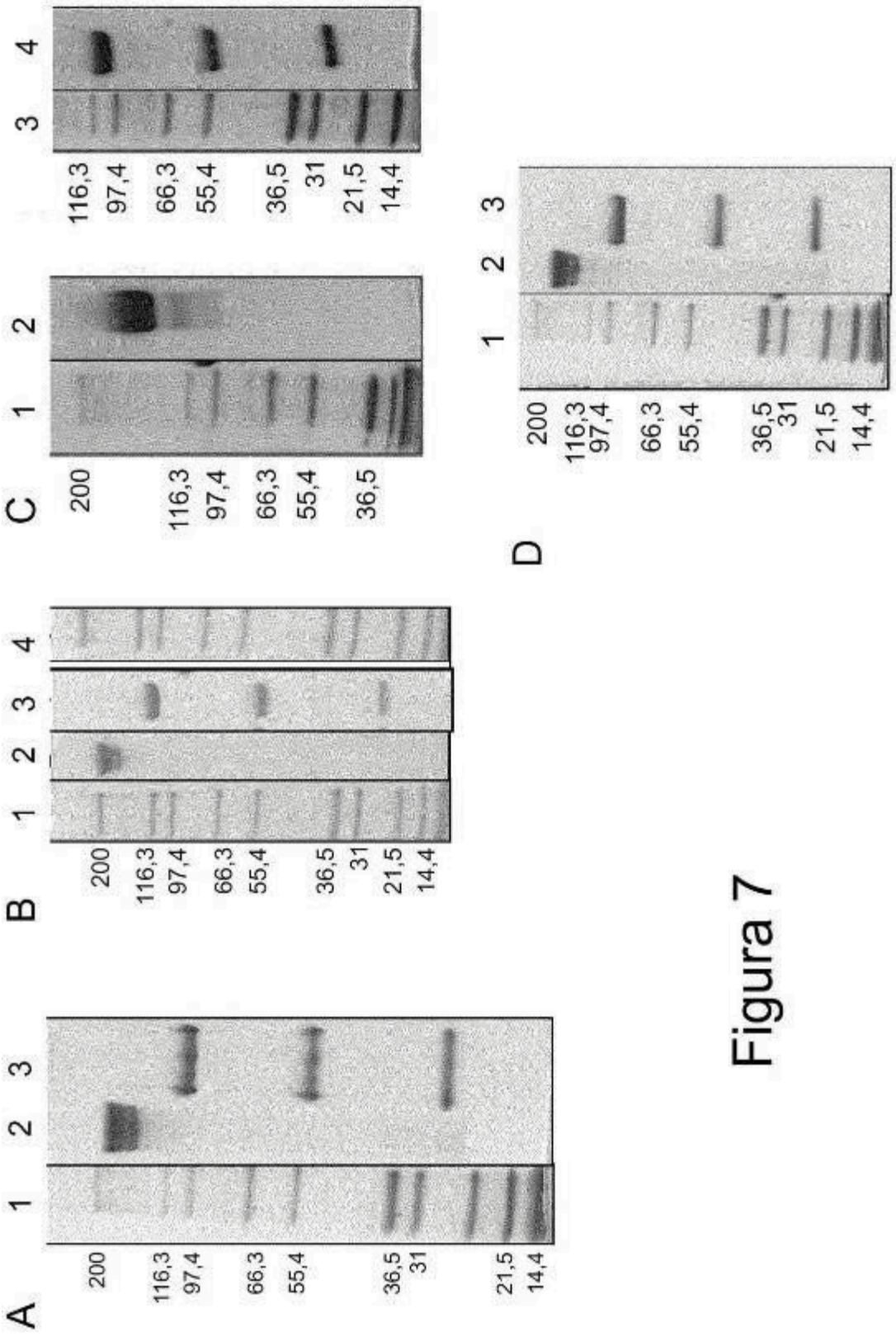

A
1
2
3
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
B
1
2
3
4
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
1
2
3
4
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
D
1
2
3
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4

Figura 7

Figura 8

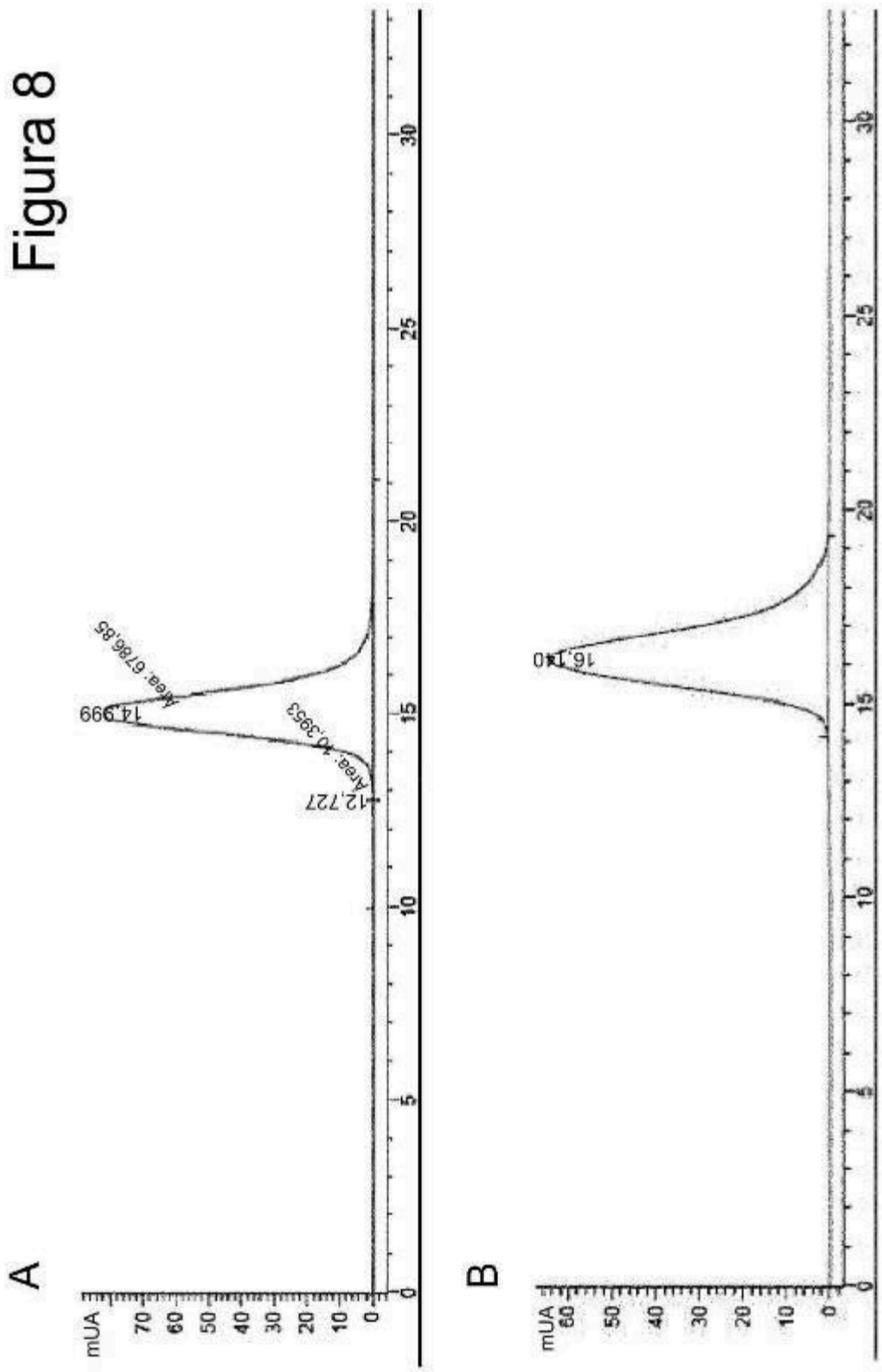

A
mUA
70
60
50
40
30
20
10
0
5
10
15
20
25
30
14,999
Area: 6786,85
12,727
Area: 40,3953
B
mUA
60
50
40
30
20
10
0
5
10
15
20
25
30
16,140

Figura 8

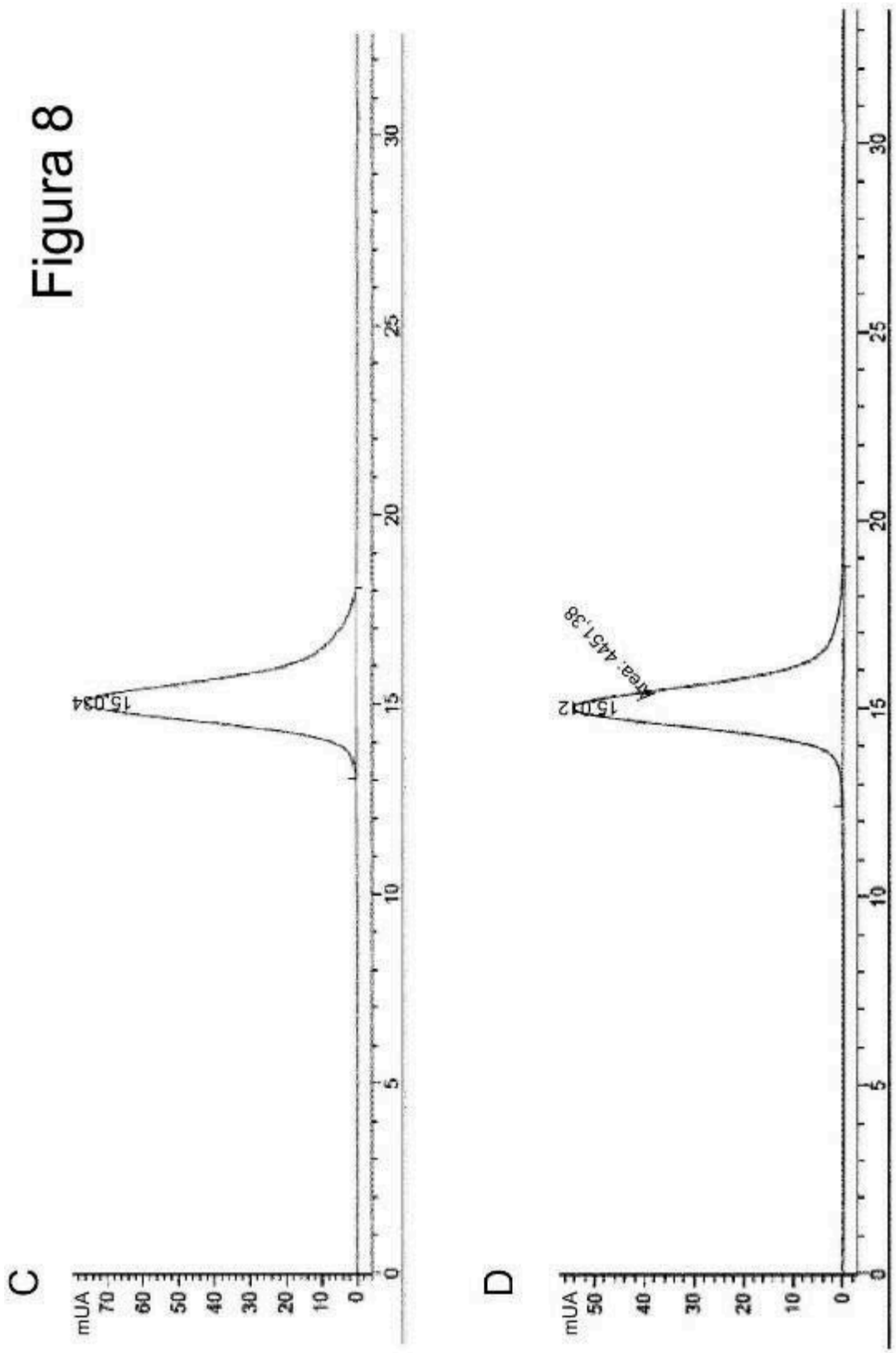

C
mUA
70
60
50
40
30
20
10
0
15,034
0
5
10
15
20
25
30
D
mUA
50
40
30
20
10
0
15,012
Area: 451,38
0
5
10
15
20
25
30

Figura 9

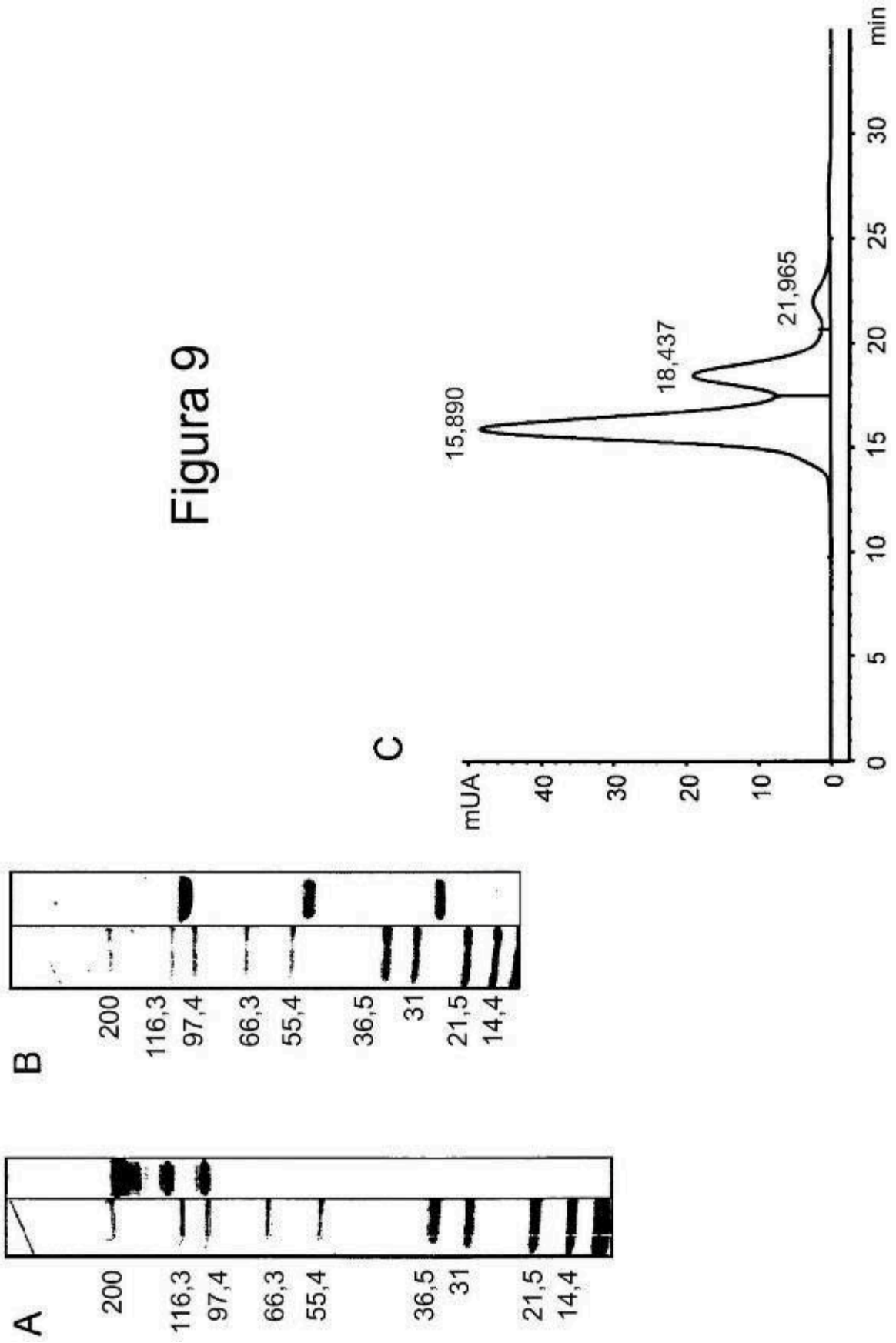

A
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
B
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
mUA
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
min
15,890
18,437
21,965

Figura 10

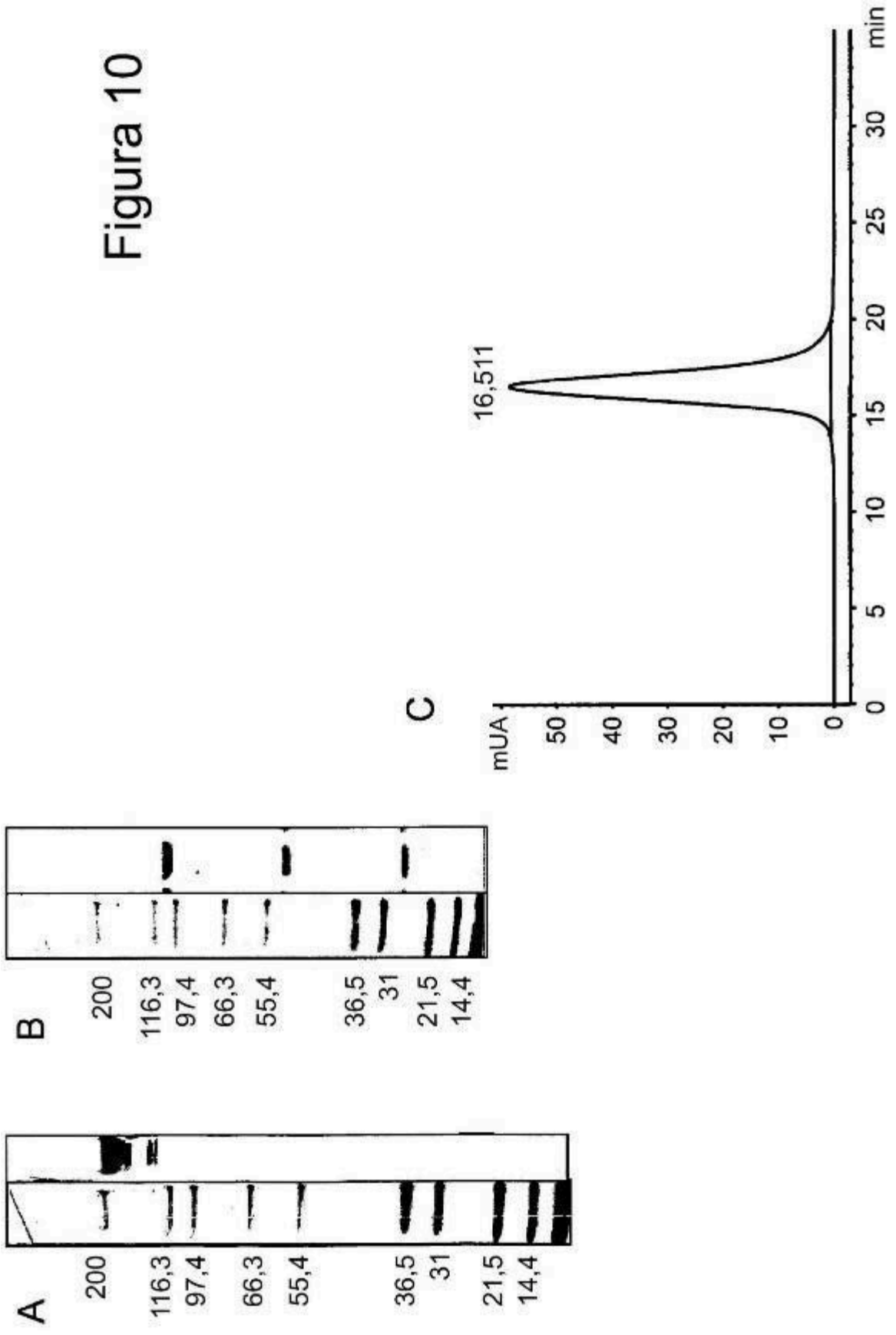
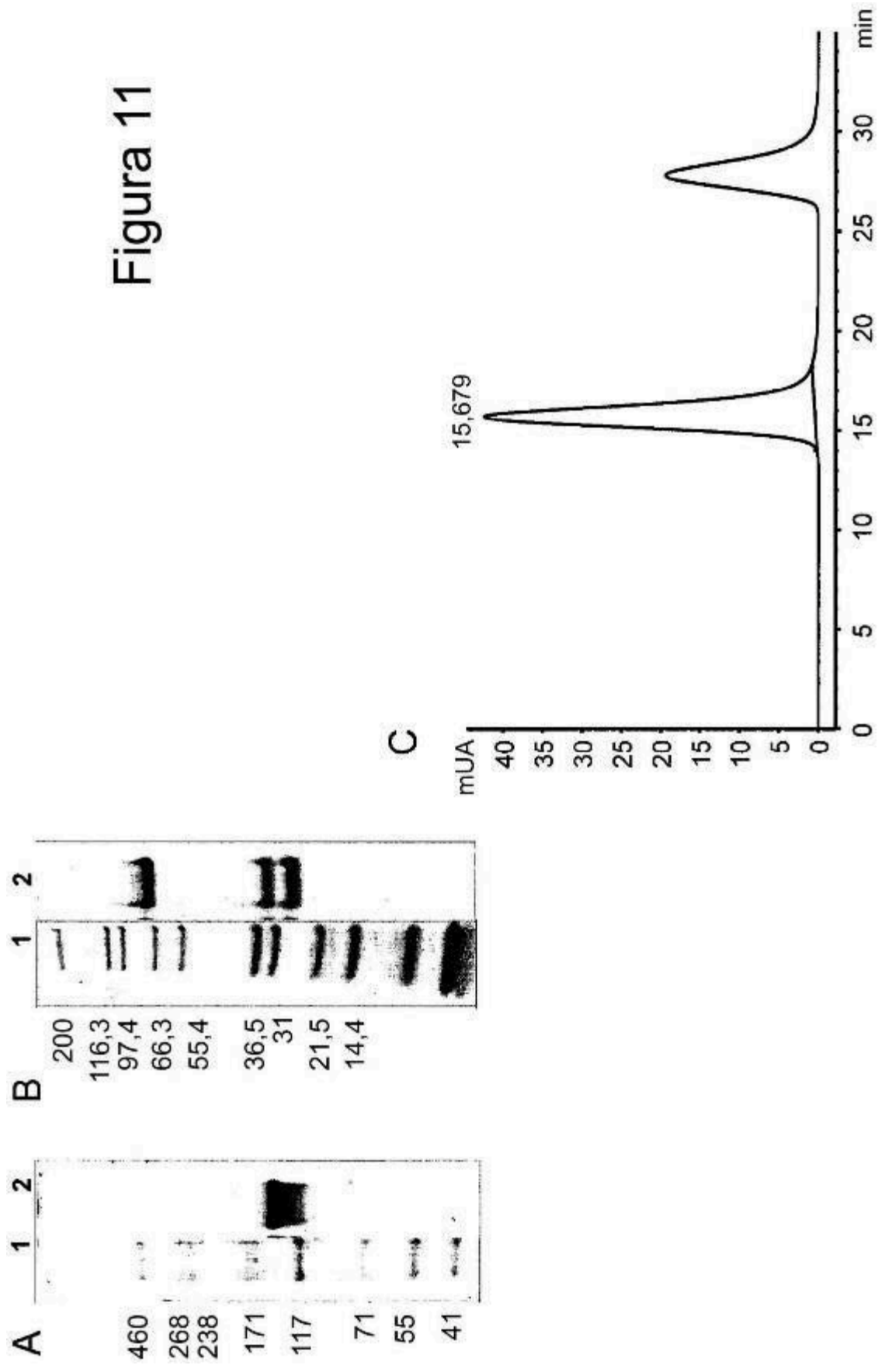

A
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
B
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
16,511
mUA
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
min

Figura 11


A
1
2
460
268
238
171
117
71
55
41
B
1
2
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
15,679
mUA
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
min

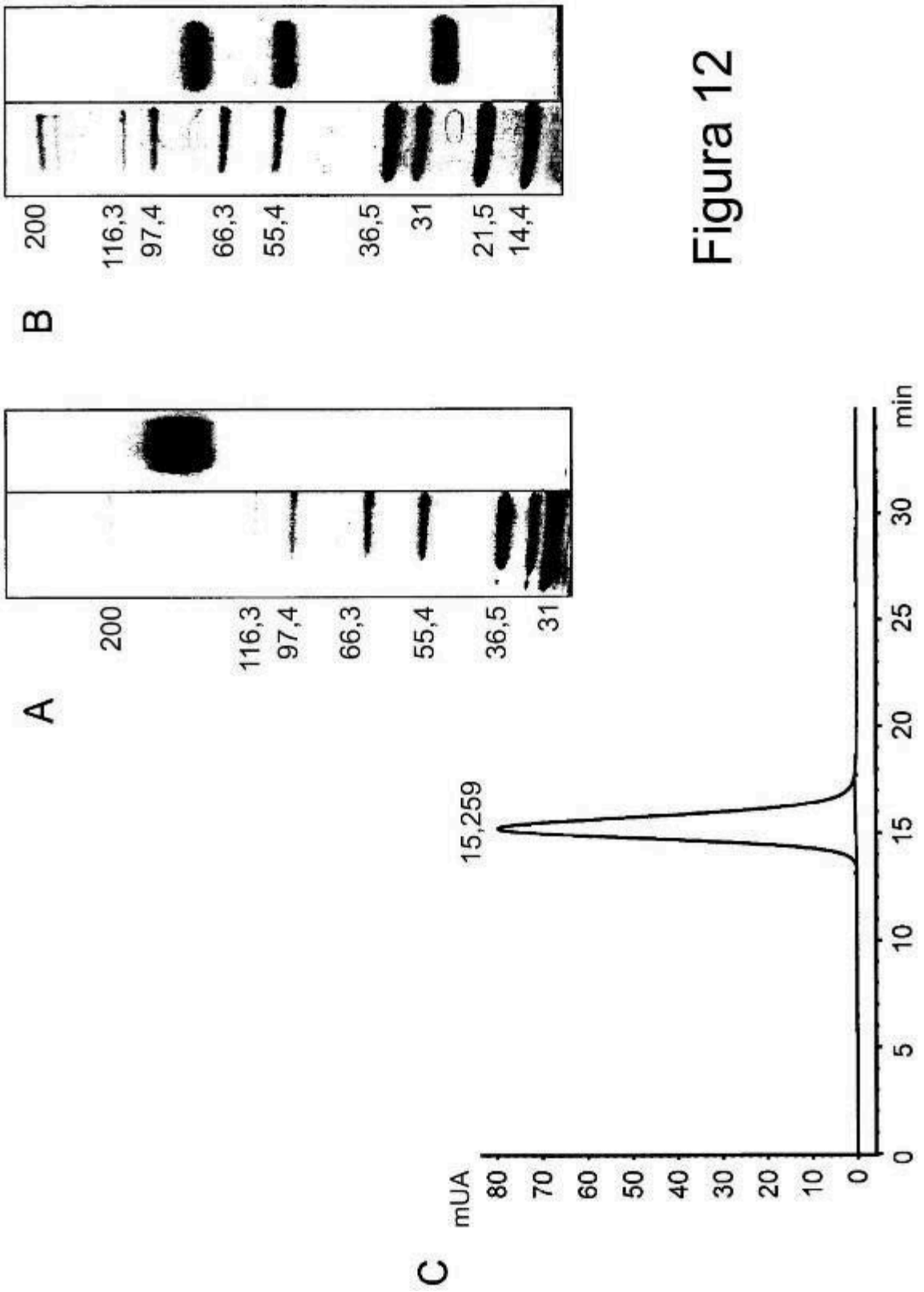
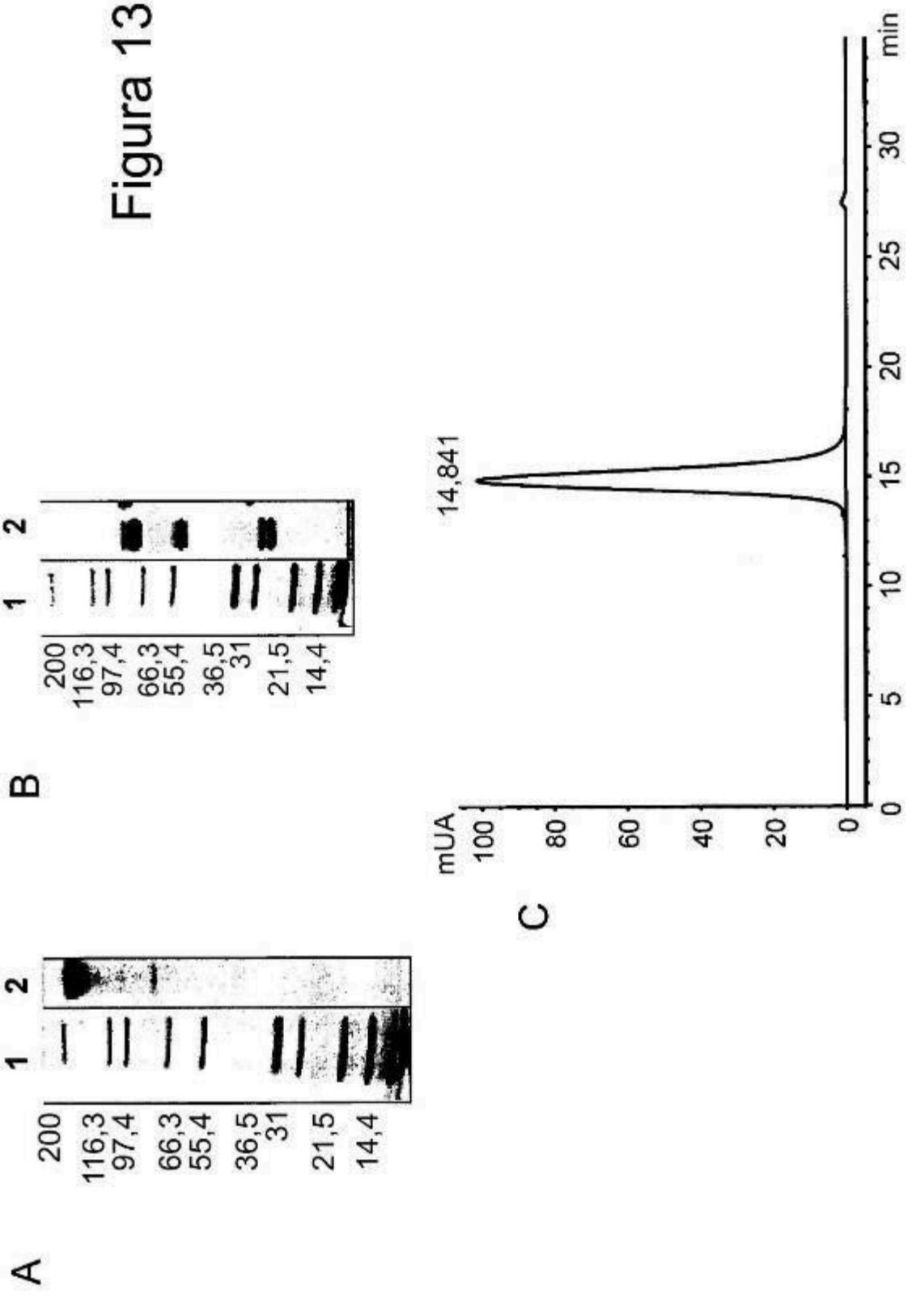

A
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
B
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
mUA
80
70
60
50
40
30
20
10
0
15,259
0
5
10
15
20
25
30
min

Figura 12

Figura 13


A
1
2
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
B
1
2
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
14,841
mUA
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
min

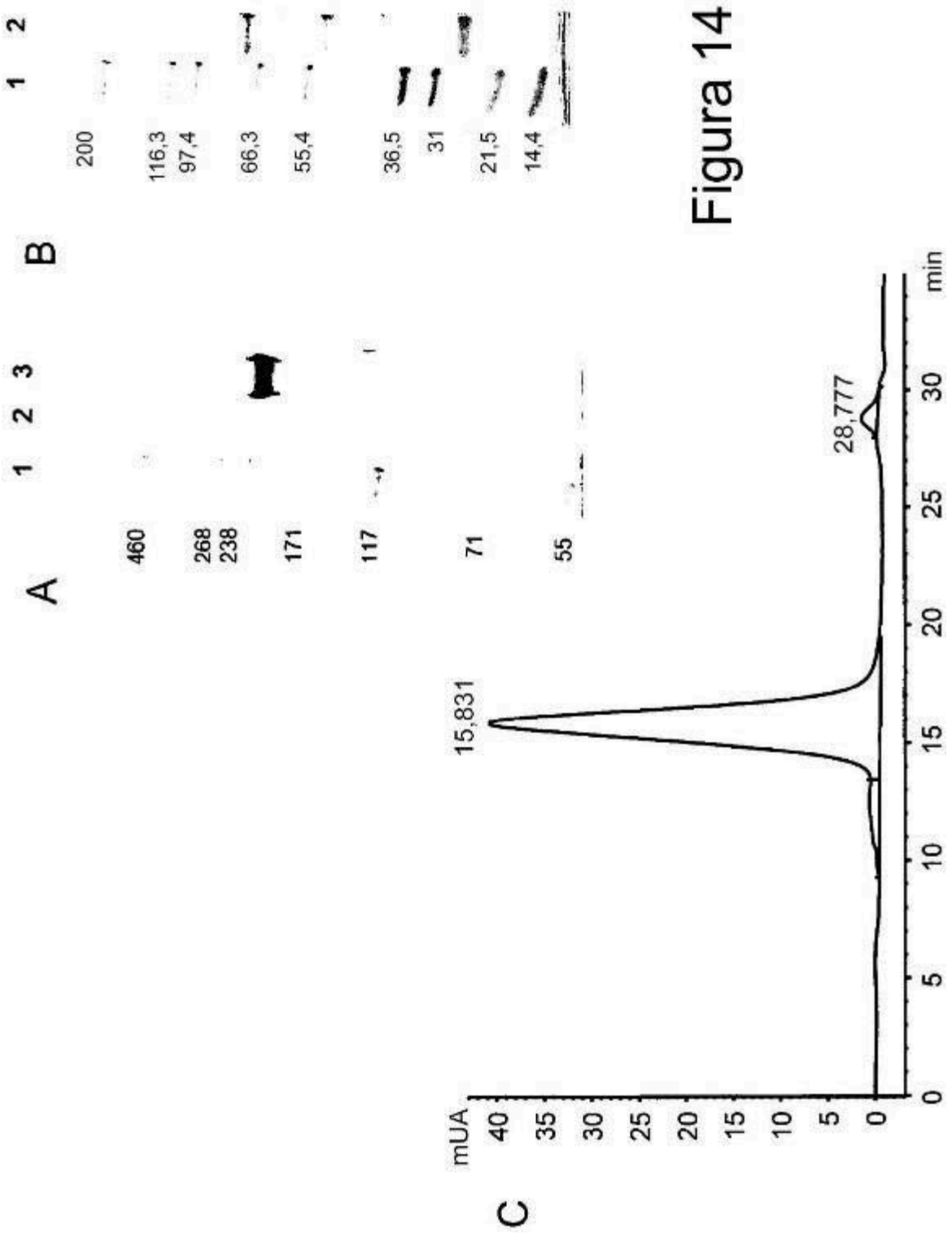
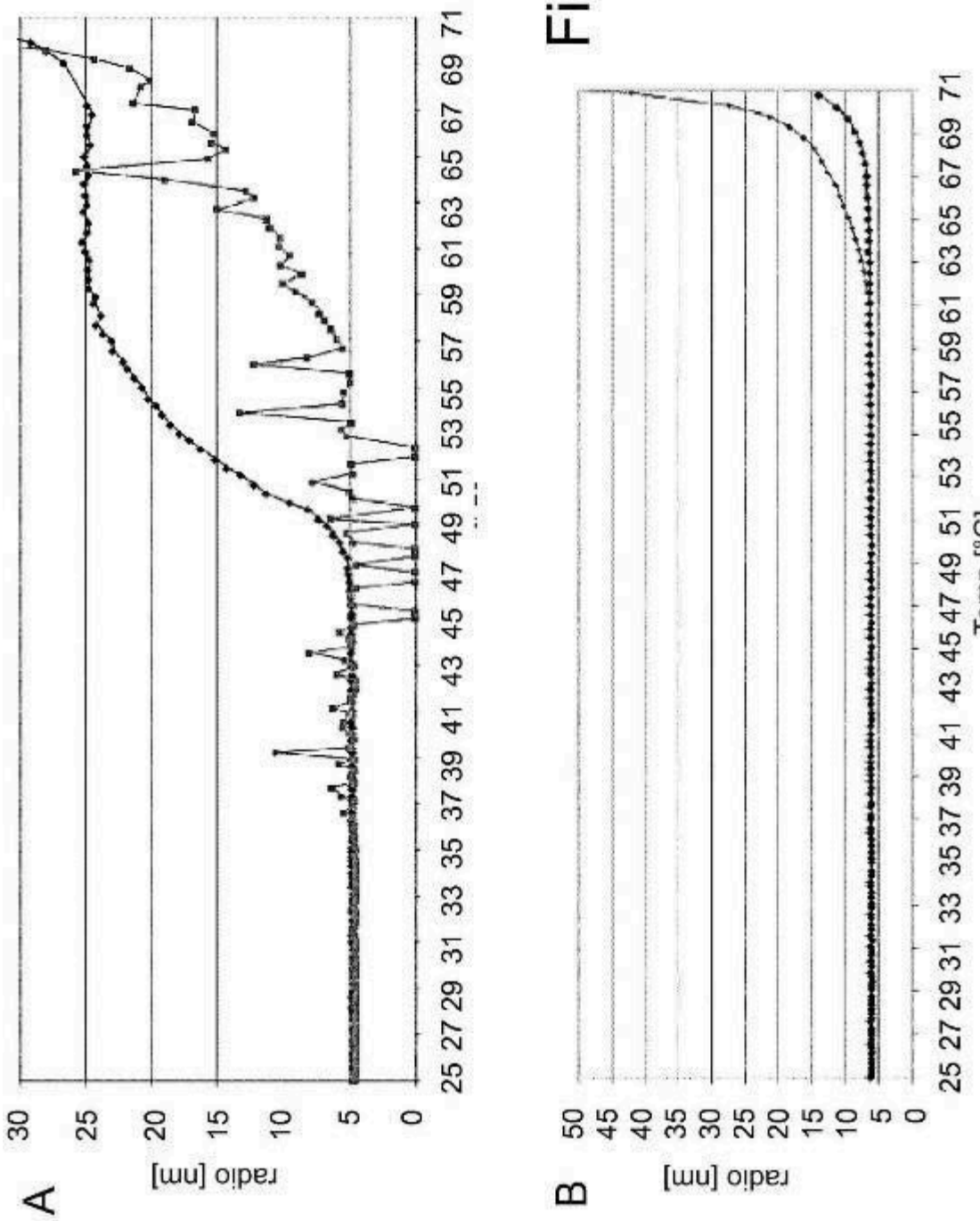

A
1 2 3
460
268
238
171
117
71
55
B
1 2
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
C
mUA
40
35
30
25
20
15
10
5
0
15,831
28,777
0
5
10
15
20
25
30
min

Figura 14

Figura 15


A
radio [nm]
30
25
20
15
10
5
0
25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71
B
radio [nm]
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71
Temp [°C]

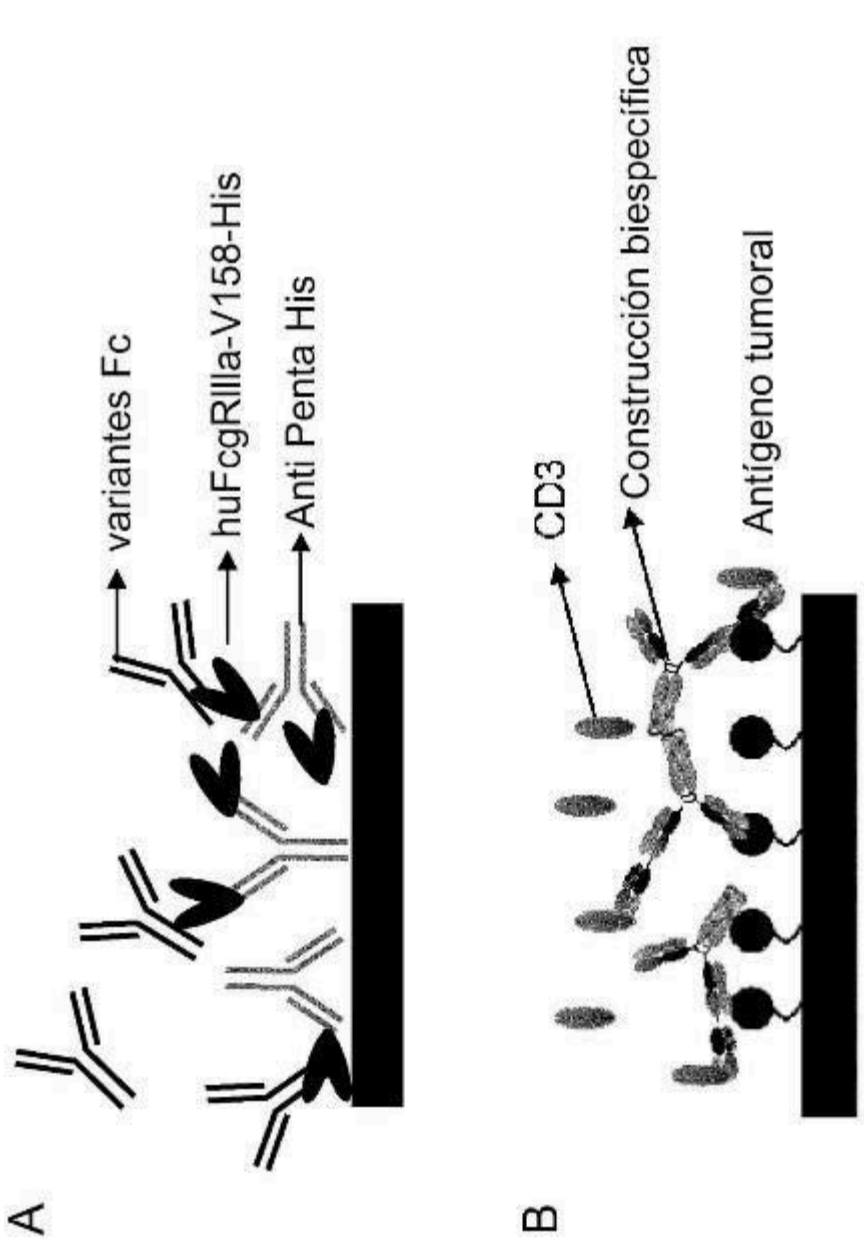

A
variantes Fc
huFcgRIIIa-V158-His
Anti Penta His
B
CD3
Construcción biespecífica
Antígeno tumoral

Figura 16

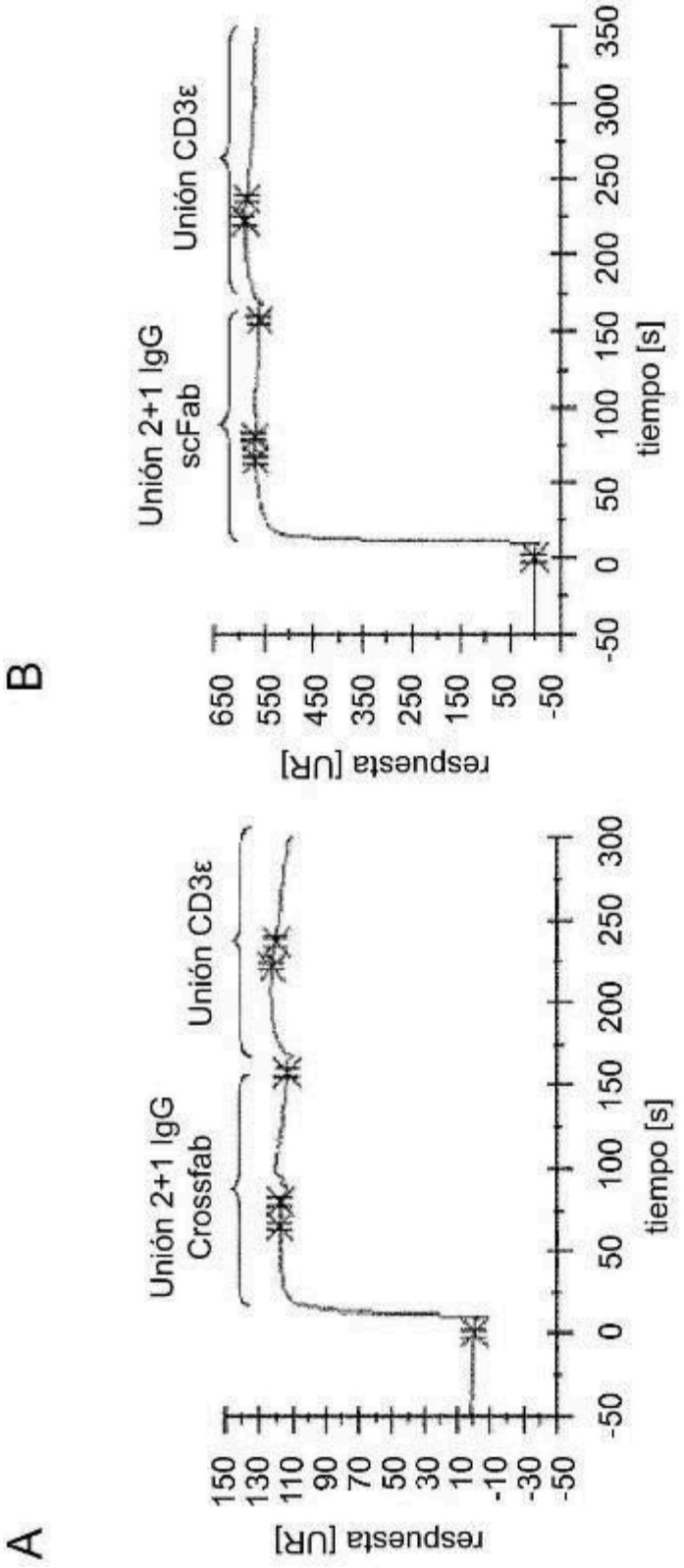

A
B
Unión 2+1 IgG Crossfab
Unión CD3ε
Unión 2+1 IgG scFab
Unión CD3ε
respuesta [UR]
tiempo [s]
150
130
110
90
70
50
30
10
-10
-30
-50
650
550
450
350
250
150
50
-50
-50
0
50
100
150
200
250
300
350

Figura 17

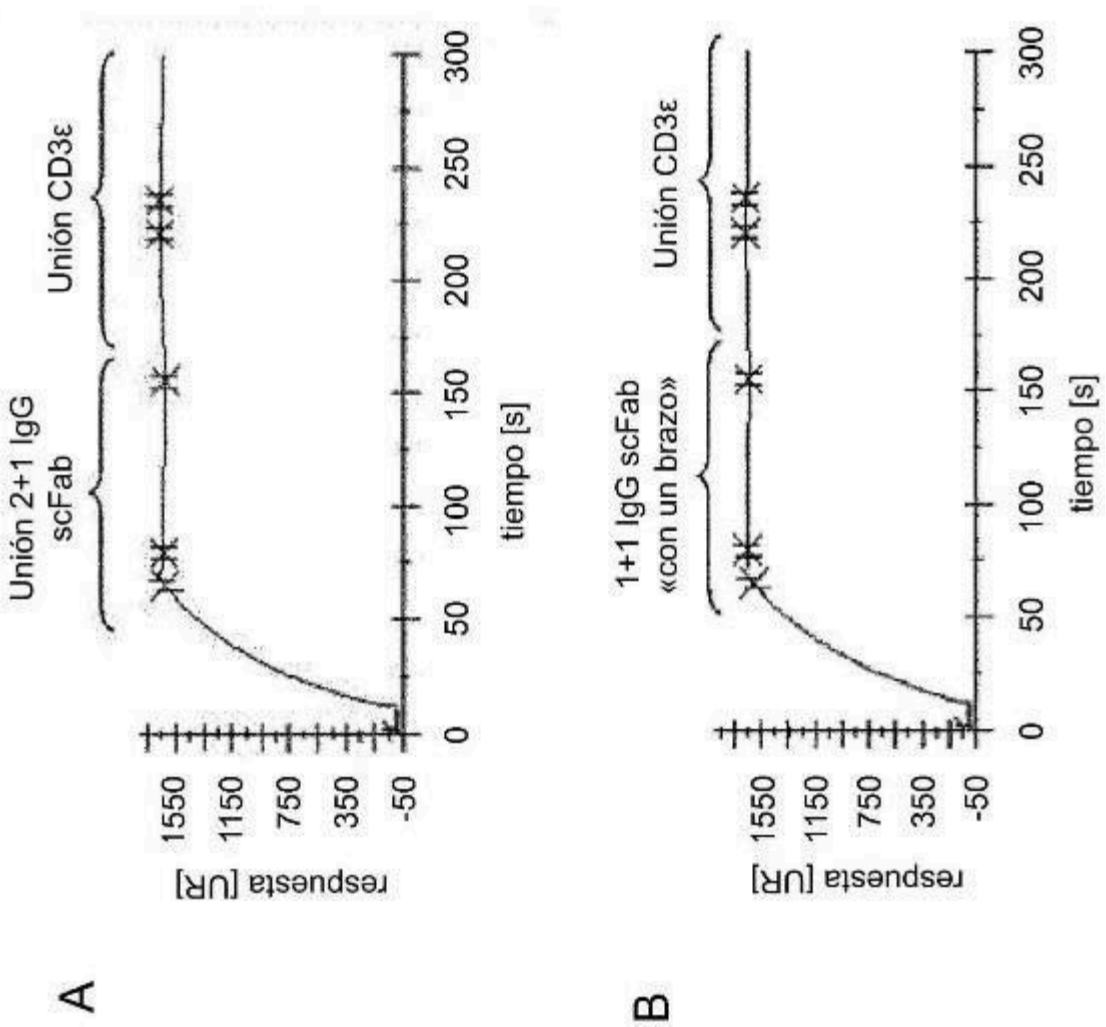

A
Unión 2+1 IgG scFab
Unión CD3ε
respuesta [UR]
1550
1150
750
350
-50
0
50
100
150
200
250
300
tiempo [s]
B
1+1 IgG scFab «con un brazo»
Unión CD3ε
respuesta [UR]
1550
1150
750
350
-50
0
50
100
150
200
250
300
tiempo [s]

Figura 18

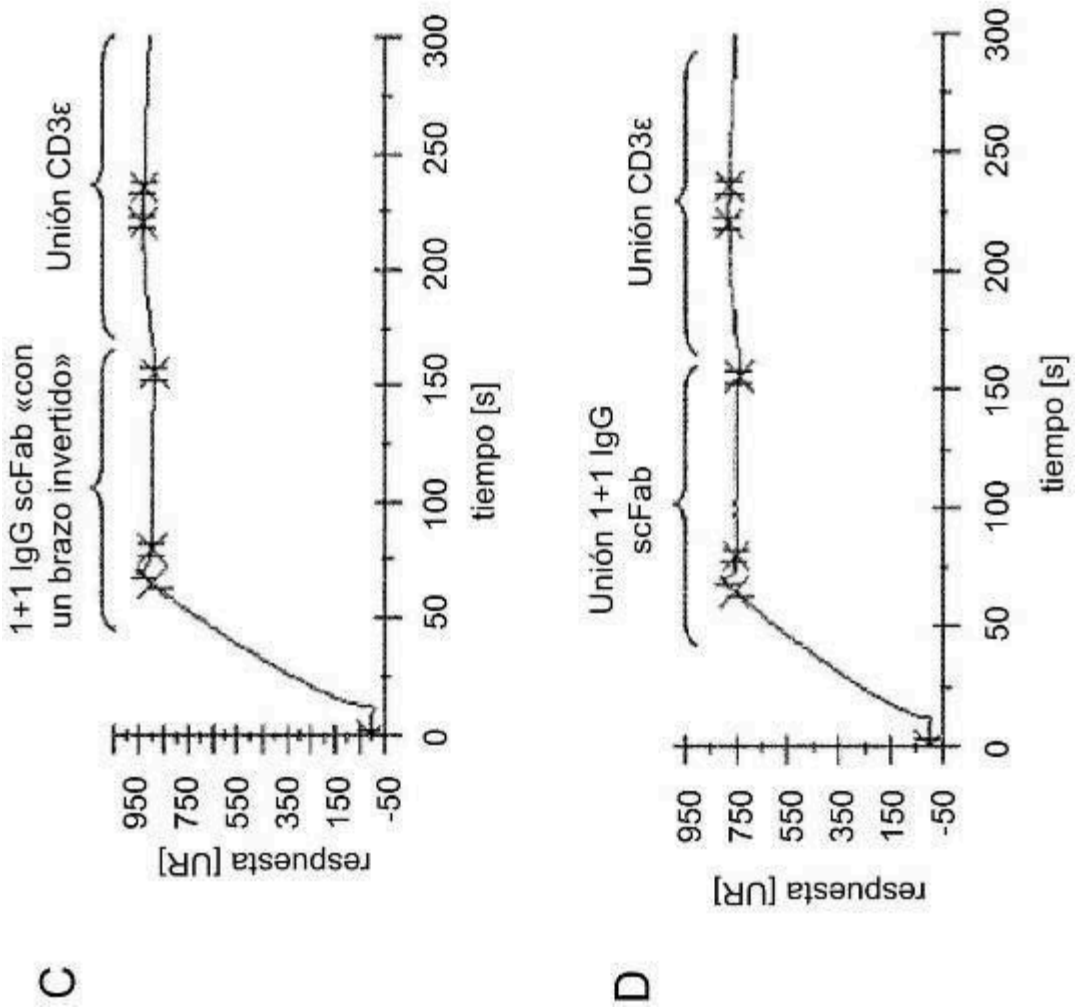
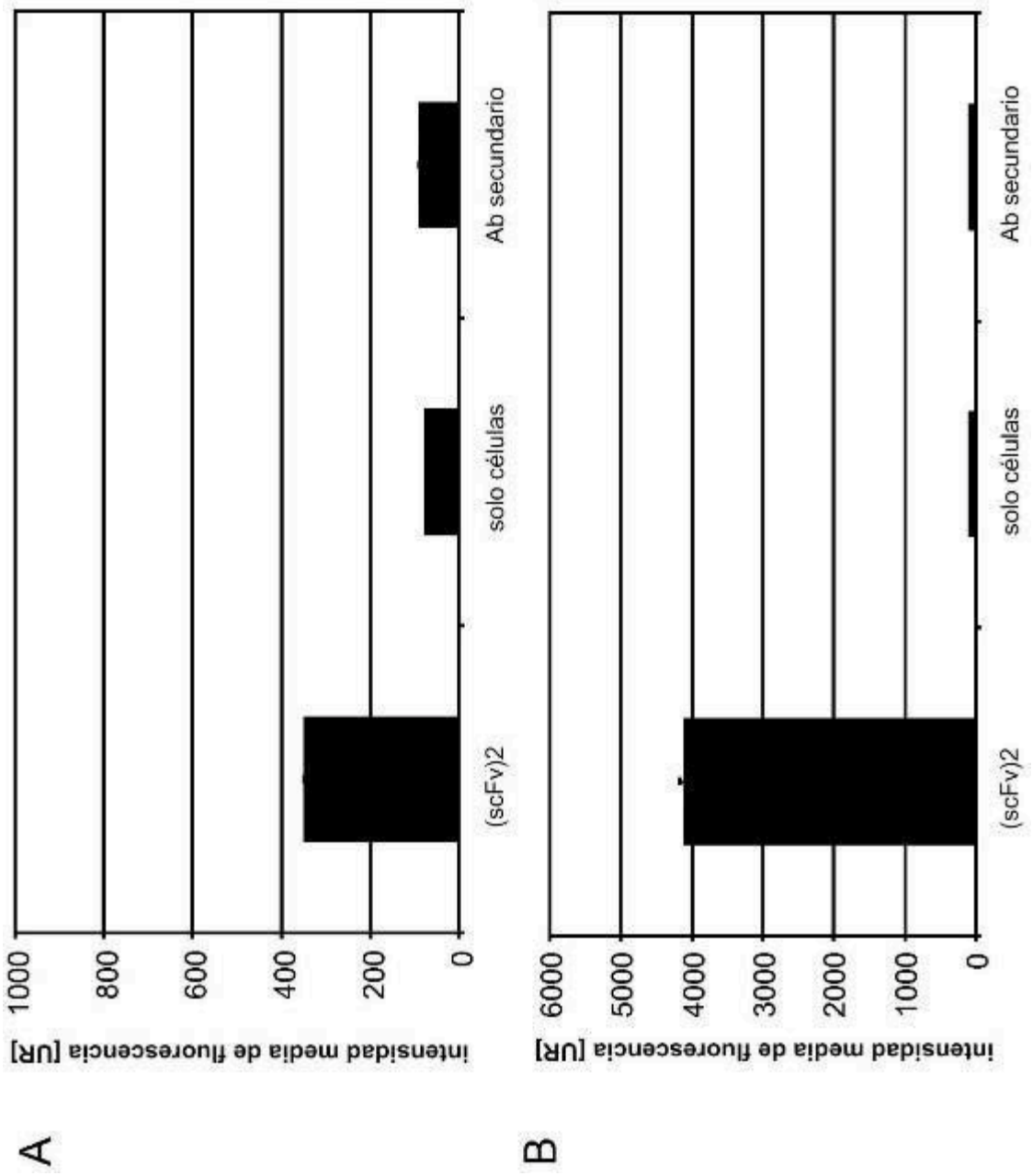

C
1+1 IgG scFab «con un brazo invertido»
Unión CD3ε
respuesta [UR]
950
750
550
350
150
-50
0
50
100
150
200
250
300
tiempo [s]
D
Unión 1+1 IgG scFab
Unión CD3ε
respuesta [UR]
950
750
550
350
150
-50
0
50
100
150
200
250
300
tiempo [s]

Figura 18

Figura 19


A
intensidad media de fluorescencia [UR]
1000
800
600
400
200
0
(scFv)2
solo células
Ab secundario
B
intensidad media de fluorescencia [UR]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
(scFv)2
solo células
Ab secundario

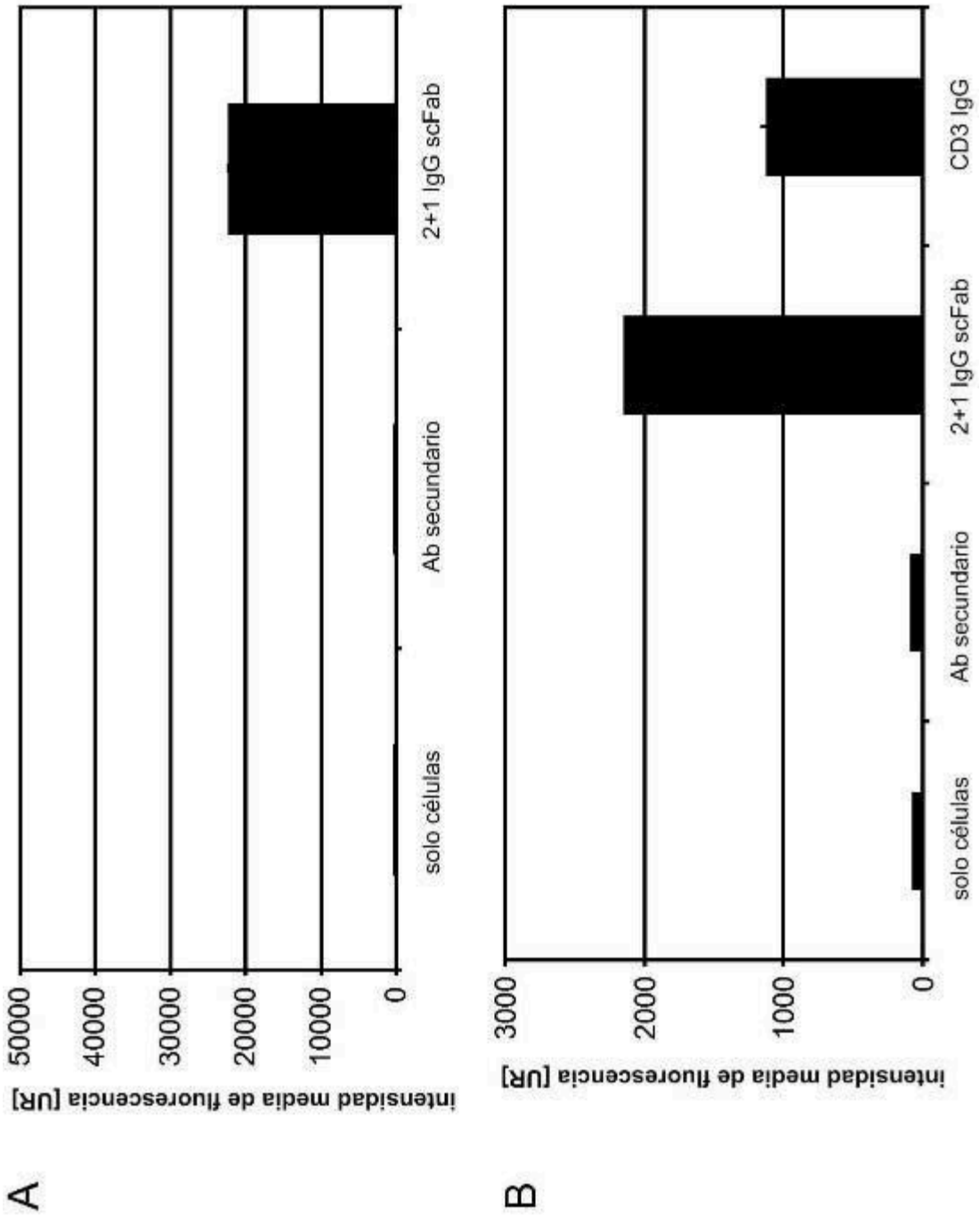

A
intensidad media de fluorescencia [UR]
50000
40000
30000
20000
10000
0
solo células
Ab secundario
2+1 IgG scFab
B
intensidad media de fluorescencia [UR]
3000
2000
1000
0
solo células
Ab secundario
2+1 IgG scFab
CD3 IgG

Figura 20

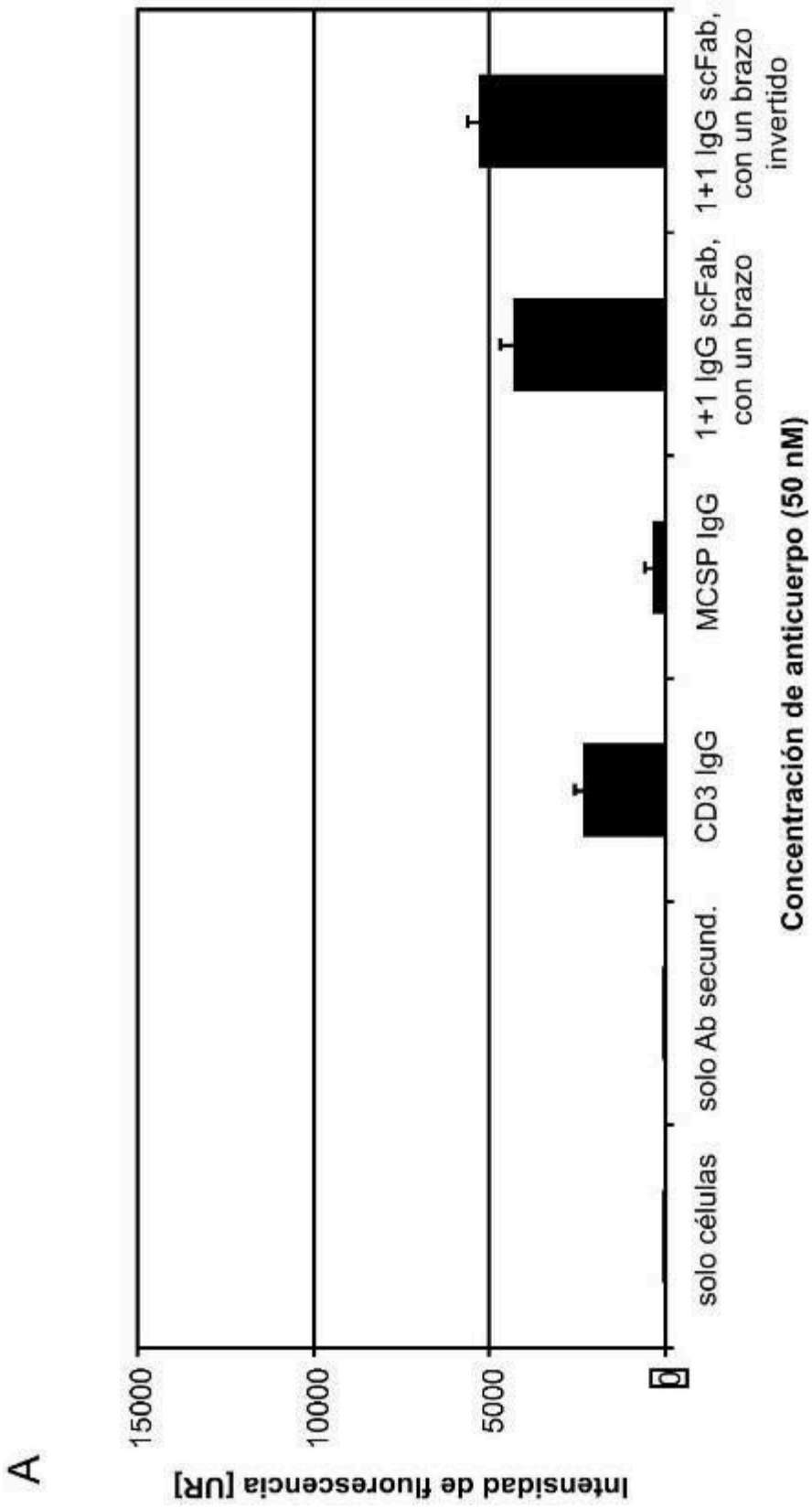

A
Intensidad de fluorescencia [UR]
15000
10000
5000
0
solo células
solo Ab secund.
CD3 IgG
MCSP IgG
1+1 IgG scFab, con un brazo
1+1 IgG scFab, con un brazo invertido
Concentración de anticuerpo (50 nM)

Figura 21

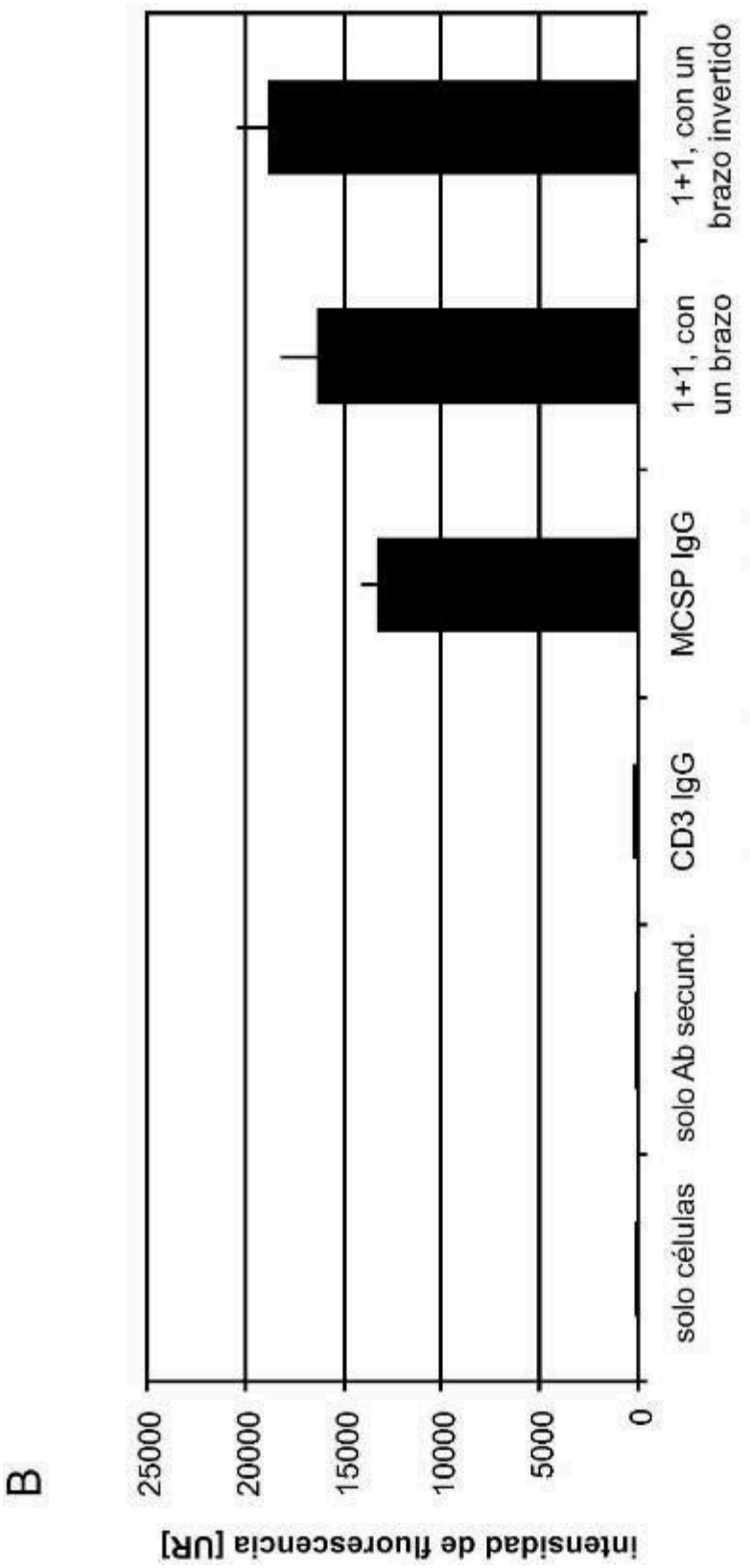

B
intensidad de fluorescencia [UR]
25000
20000
15000
10000
5000
0
solo células
solo Ab secund.
CD3 IgG
MCSP IgG
1+1, con un brazo
1+1, con un brazo invertido
Concentración de anticuerpo (50 nM)

Figura 21

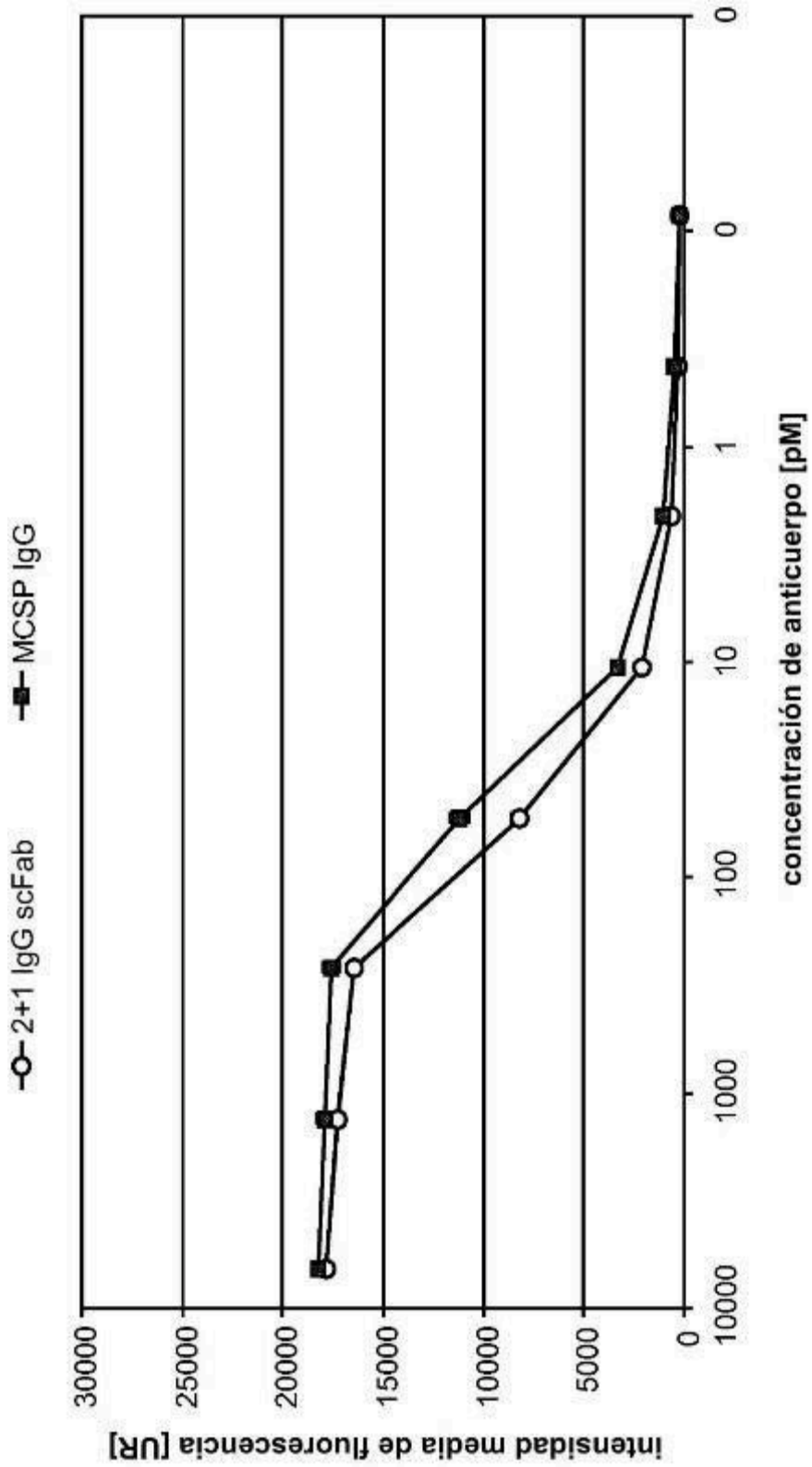

2+1 IgG scFab
MCSP IgG
intensidad media de fluorescencia [UR]
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
10000
1000
100
10
1
0
0
0
concentración de anticuerpo [pM]

Figura 22

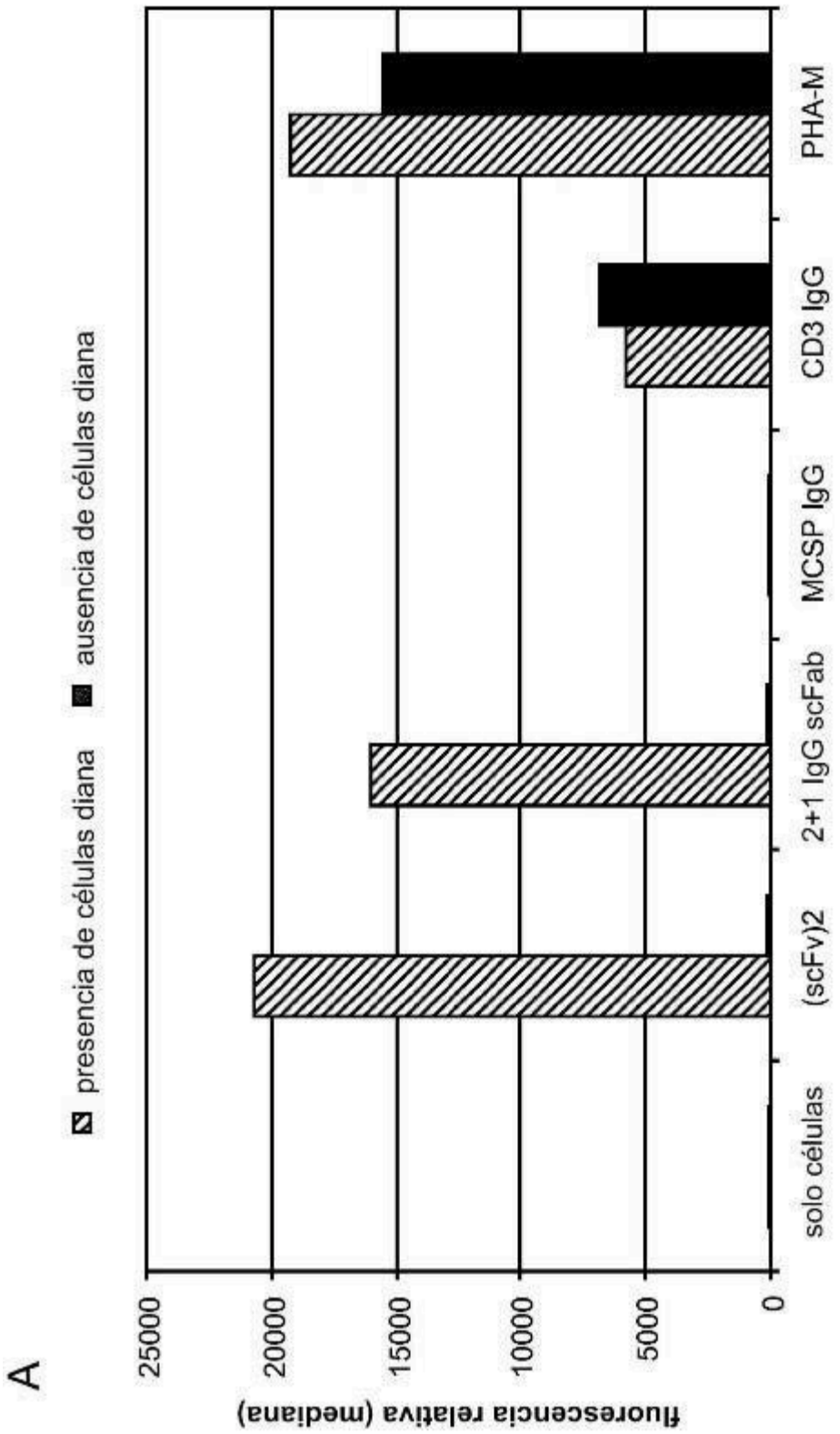

A
presencia de células diana
ausencia de células diana
fluorescencia relativa (mediana)
25000
20000
15000
10000
5000
0
solo células
(scFv)2
2+1 IgG scFab
MCSP IgG
CD3 IgG
PHA-M
compuestos (1 nM)

Figura 23

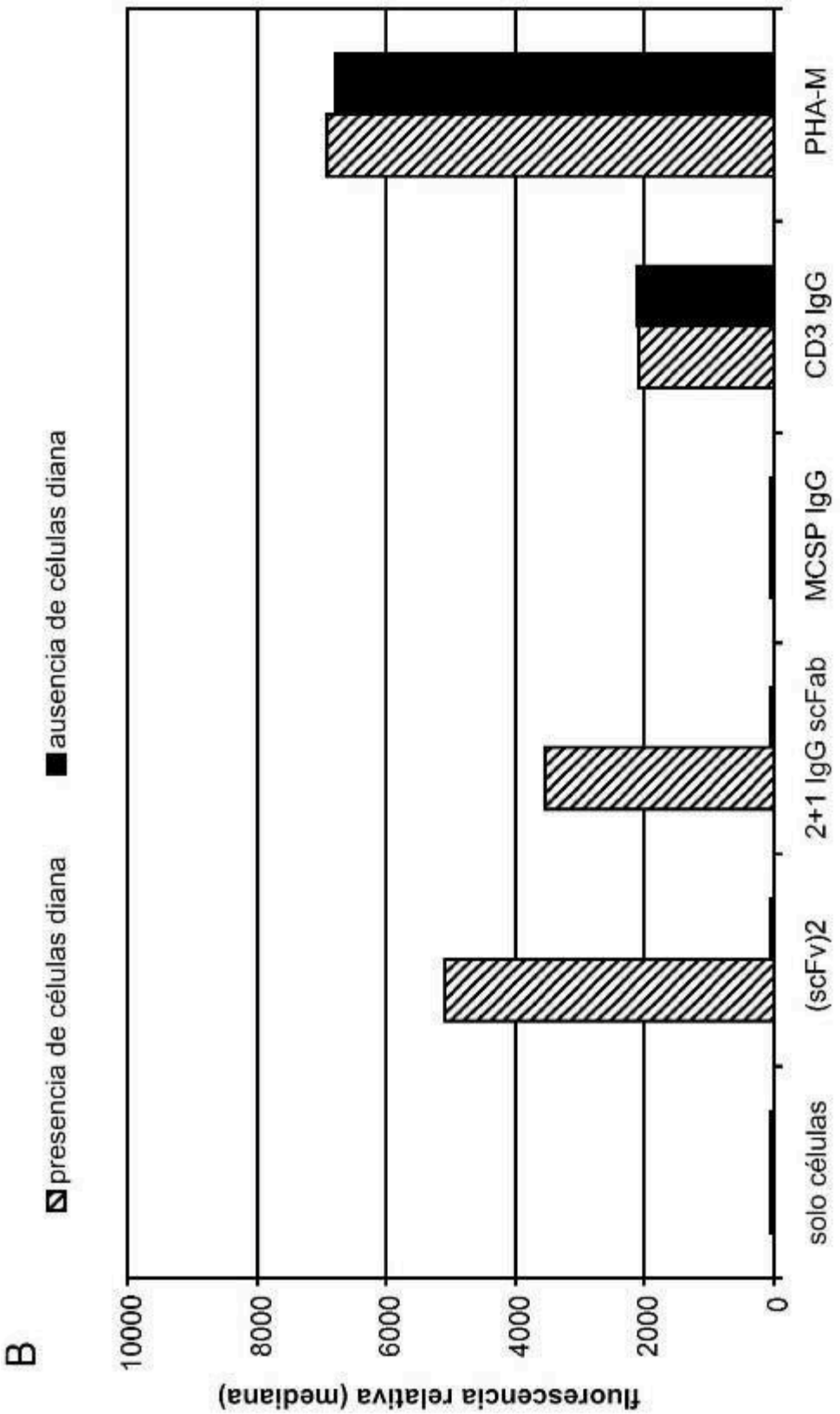

B
presencia de células diana
ausencia de células diana
fluorescencia relativa (mediana)
10000
8000
6000
4000
2000
0
solo células
(scFv)2
2+1 IgG scFab
MCSP IgG
CD3 IgG
PHA-M
compuestos (1 nM)

Figura 23

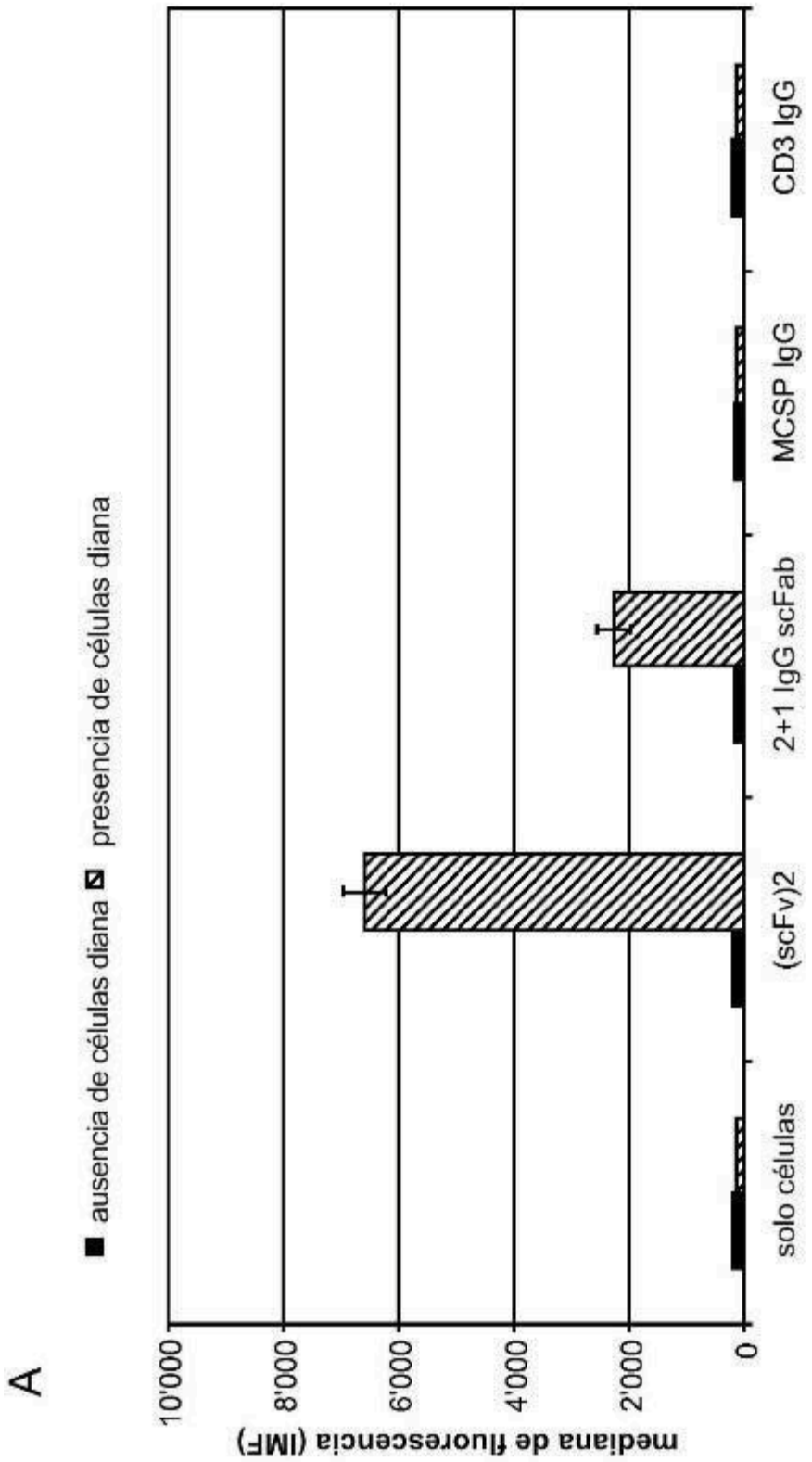

A
ausencia de células diana
presencia de células diana
mediana de fluorescencia (IMF)
10'000
8'000
6'000
4'000
2'000
0
solo células
(scFv)2
2+1 IgG scFab
MCSP IgG
CD3 IgG

Figura 24

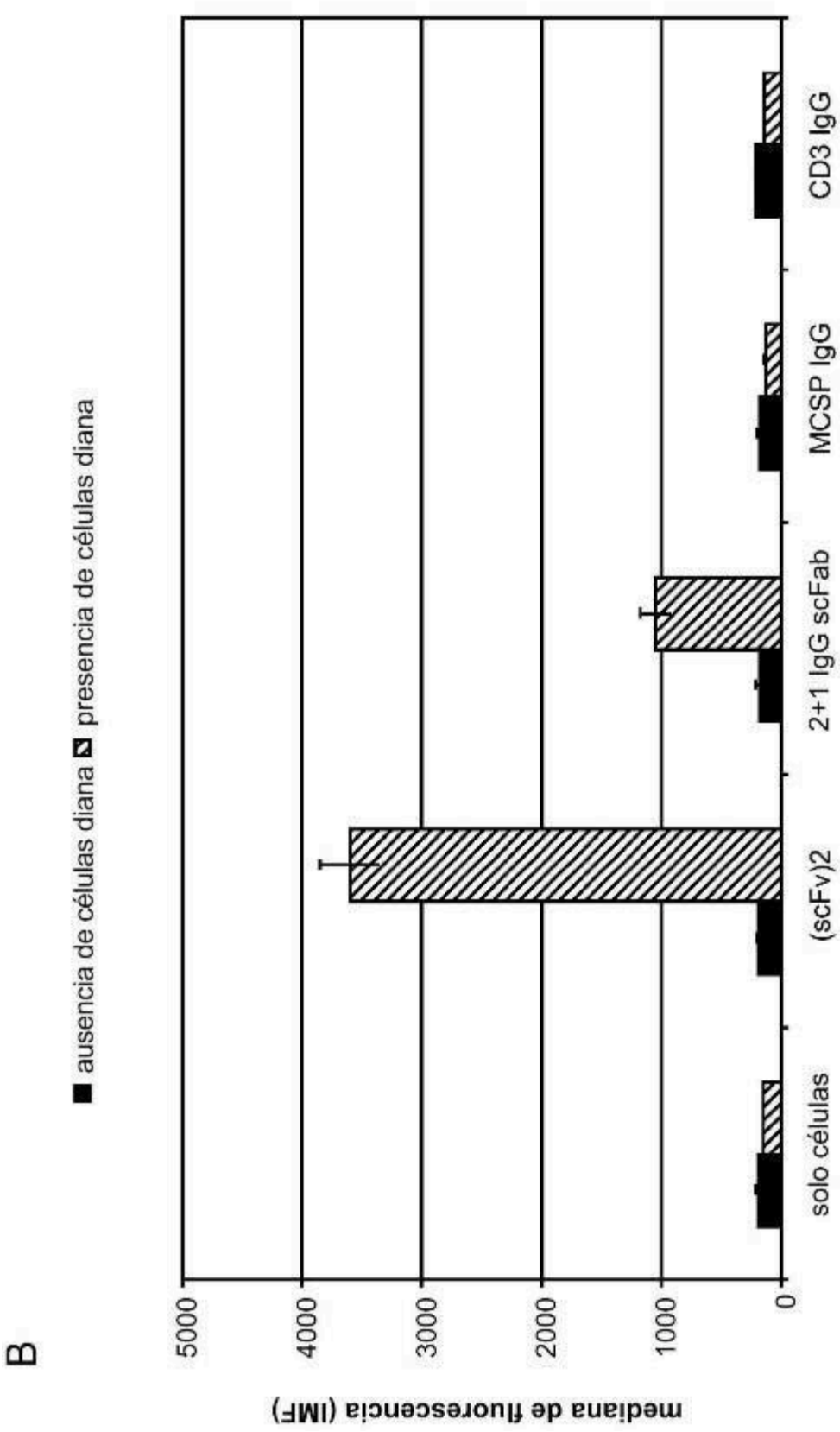

B
ausencia de células diana
presencia de células diana
mediana de fluorescencia (IMF)
5000
4000
3000
2000
1000
0
solo células
(scFv)2
2+1 IgG scFab
MCSP IgG
CD3 IgG

Figura 24

Figura 25

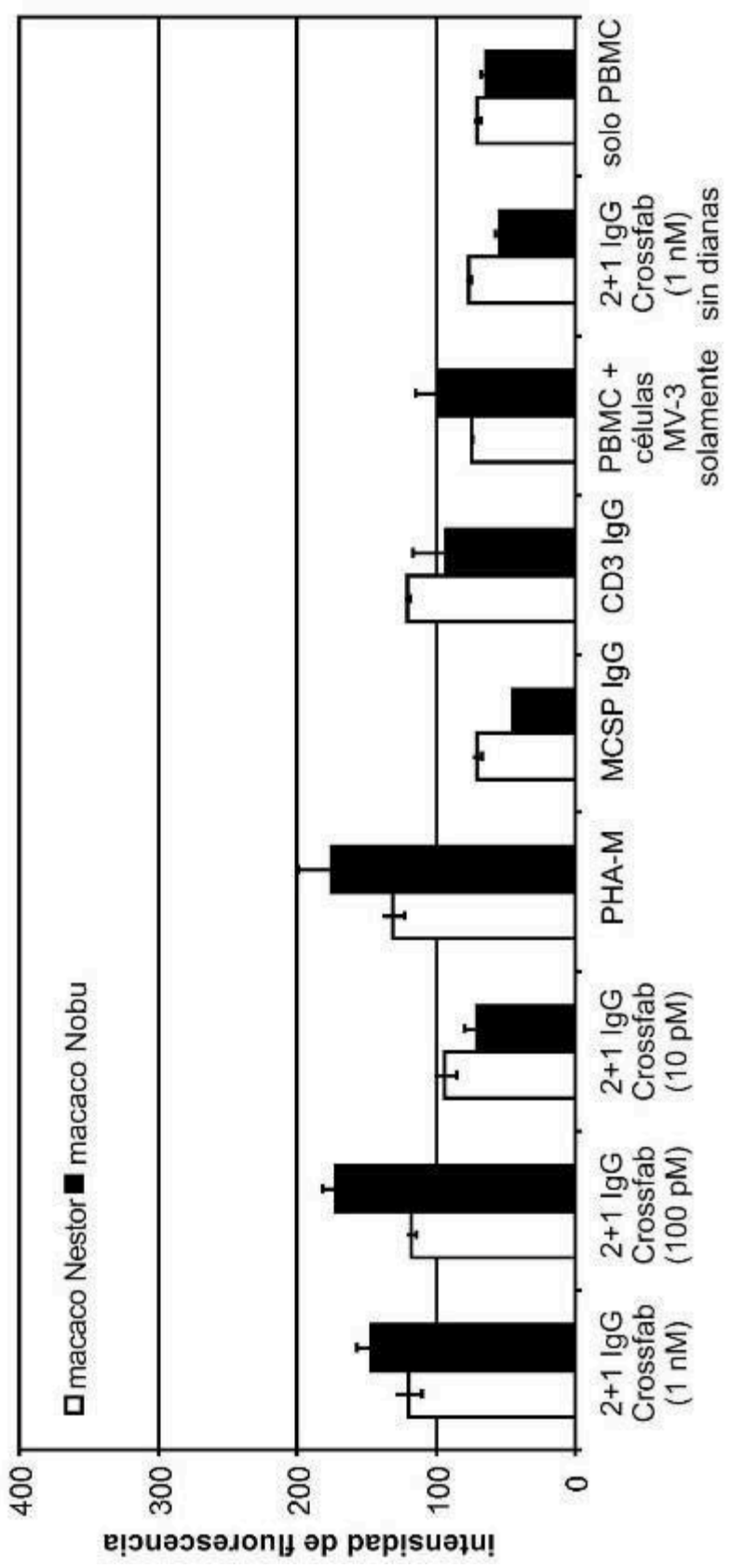

macaco Nestor
macaco Nobu
intensidad de fluorescencia
0
100
200
300
400
2+1 IgG Crossfab (1 nM)
2+1 IgG Crossfab (100 pM)
2+1 IgG Crossfab (10 pM)
PHA-M
MCSP IgG
CD3 IgG
PBMC + células MV-3 solamente
2+1 IgG Crossfab (1 nM) sin dianas
solo PBMC

Figura 26

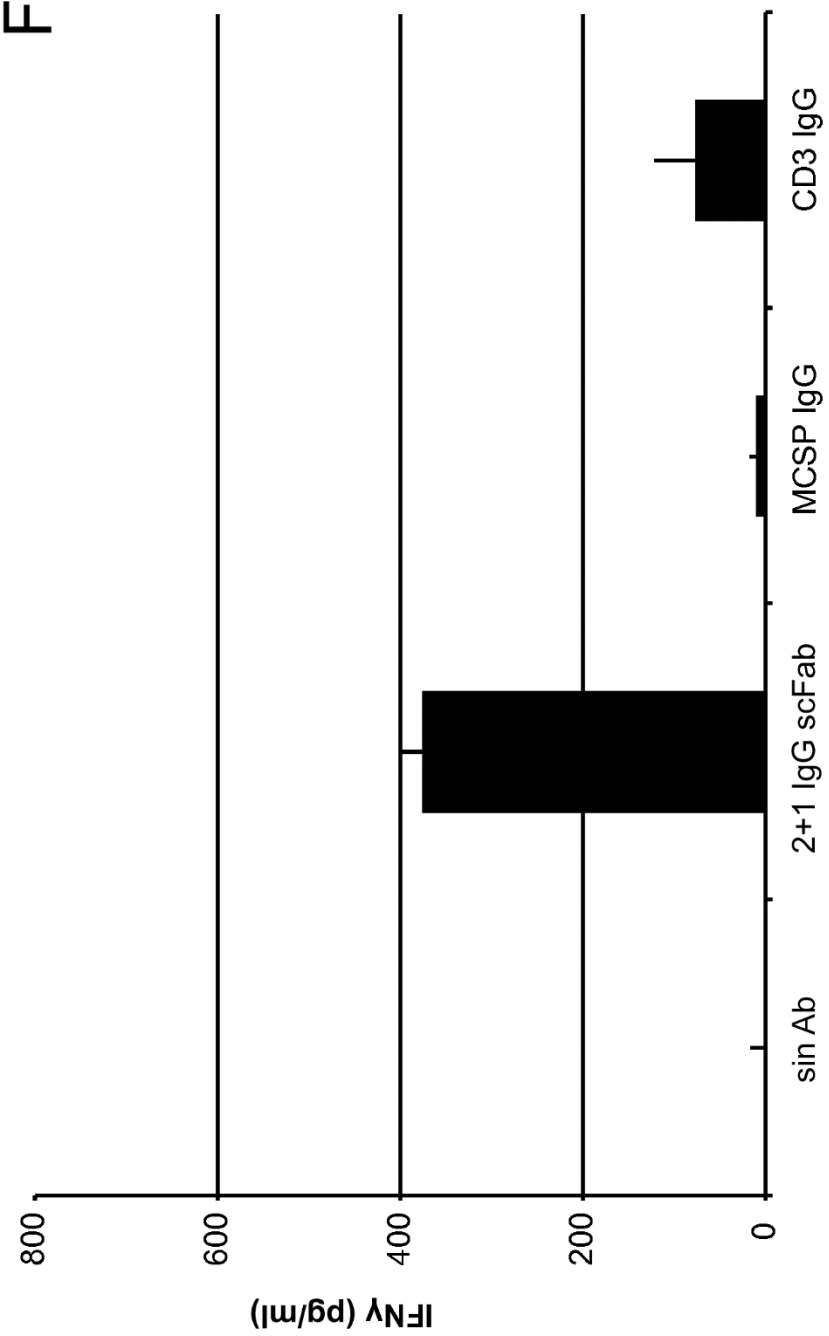


Figura 27

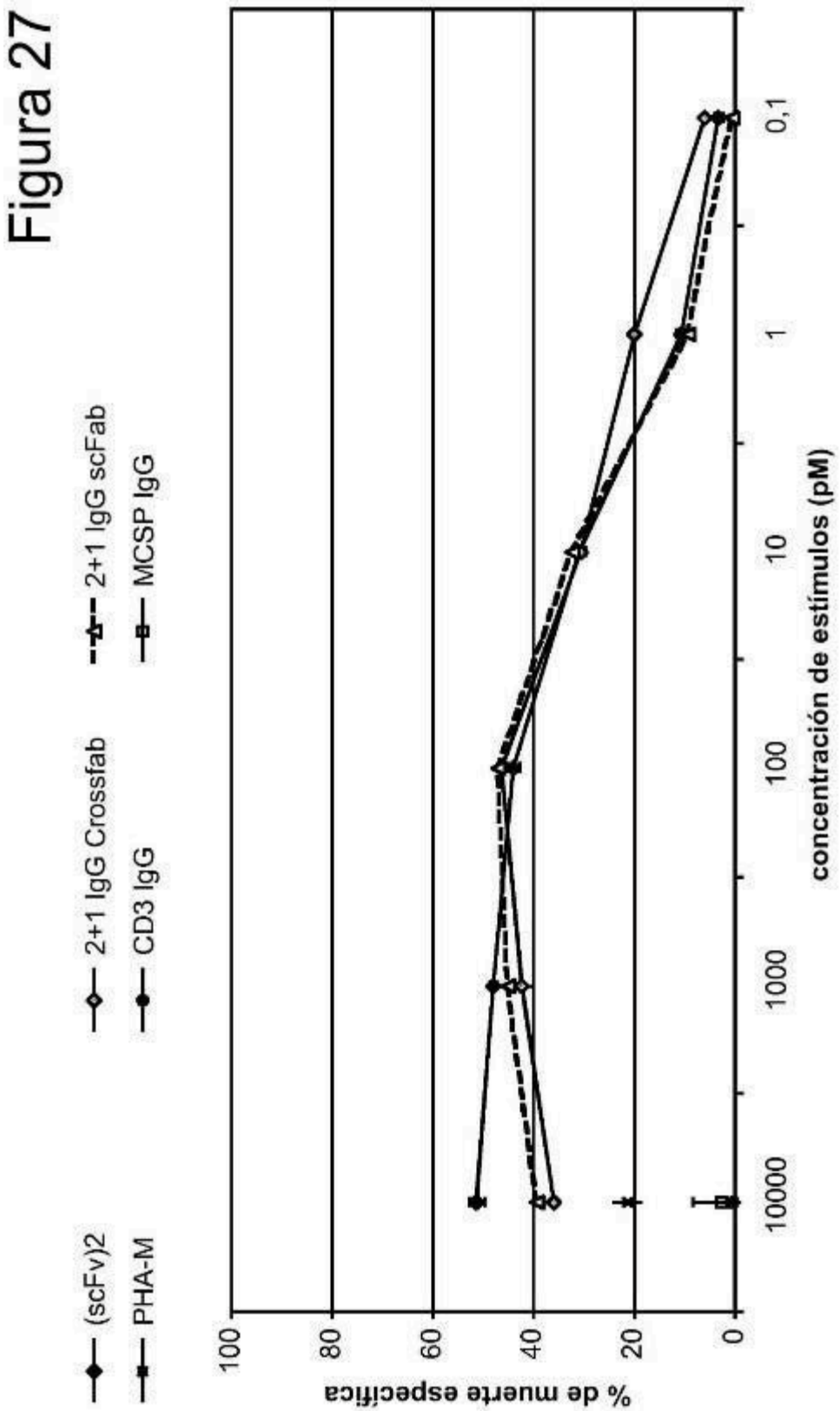

(scFv)2
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG scFab
PHA-M
CD3 IgG
MCSP IgG
% de muerte específica
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
concentración de estímulos (pM)

Figura 28

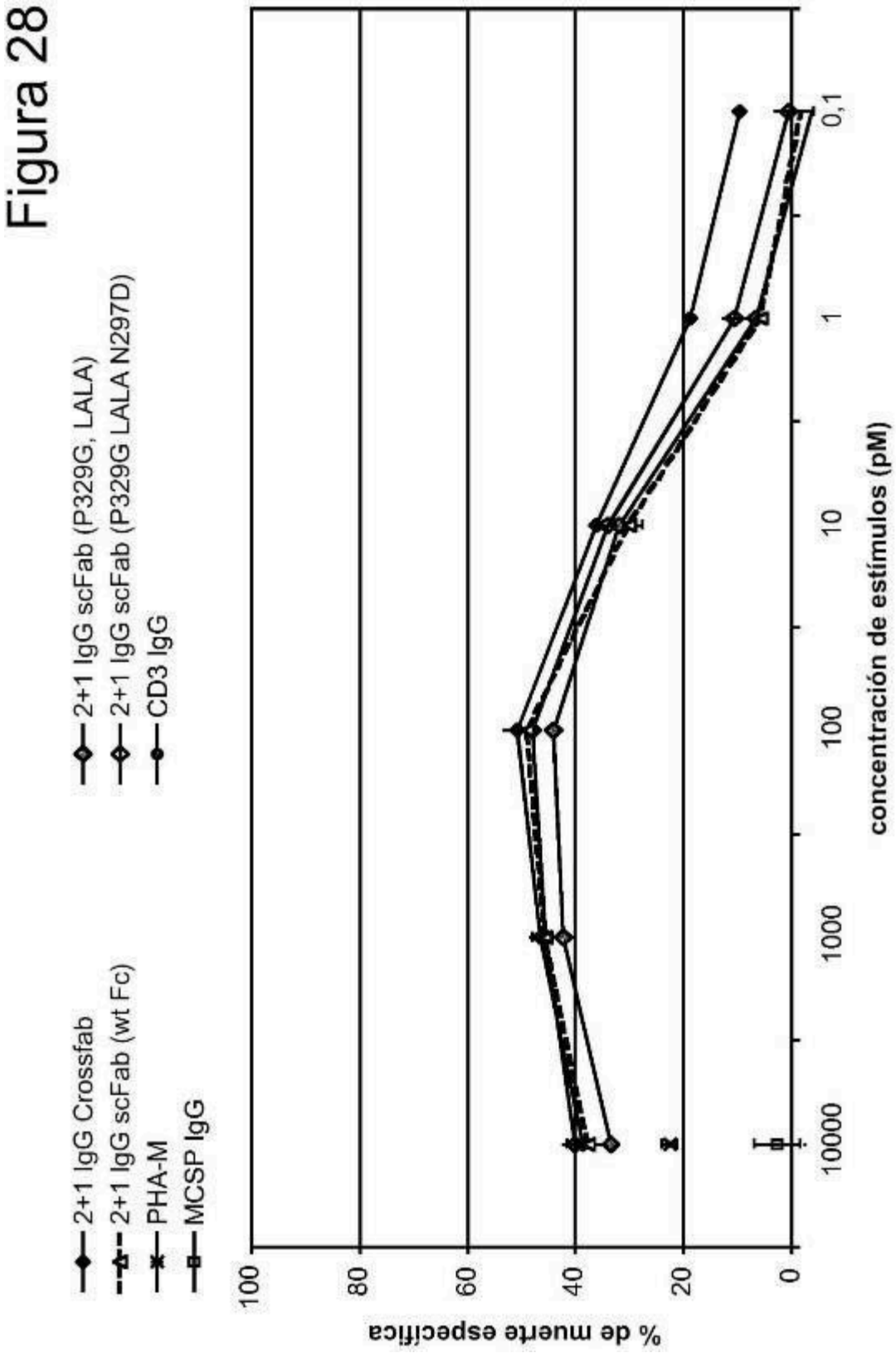

2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG scFab (wt Fc)
PHA-M
MCSP IgG
2+1 IgG scFab (P329G, LALA)
2+1 IgG scFab (P329G LALA N297D)
CD3 IgG
% de muerte específica
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
concentración de estímulos (pM)

Figura 29

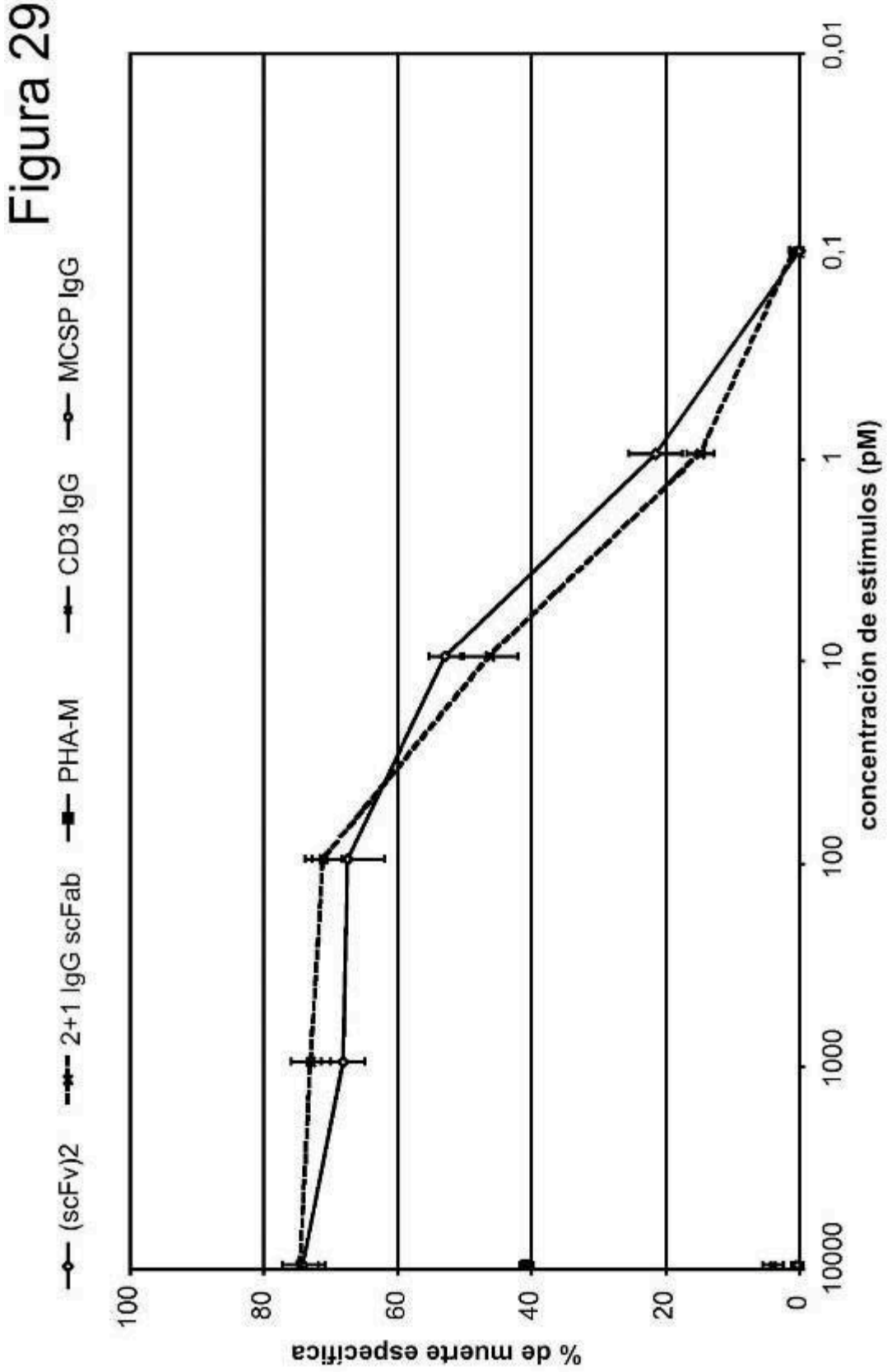

(scFv)2
2+1 IgG scFab
PHA-M
CD3 IgG
MCSP IgG
% de muerte específica
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
concentración de estímulos (pM)

Figura 30

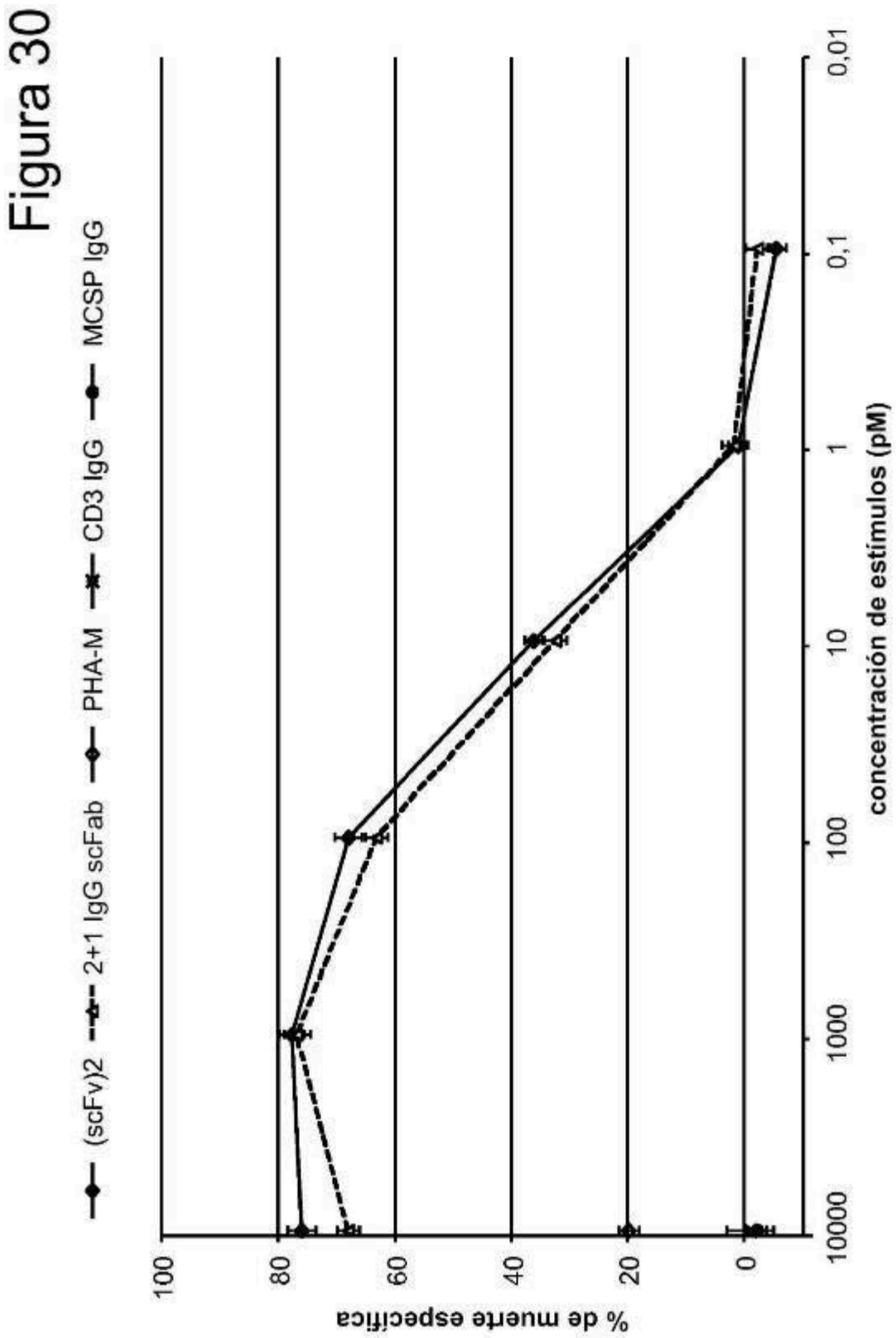

(scFv)2
2+1 IgG scFab
PHA-M
CD3 IgG
MCSP IgG
% de muerte específica
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
concentración de estímulos (pM)

Figura 31

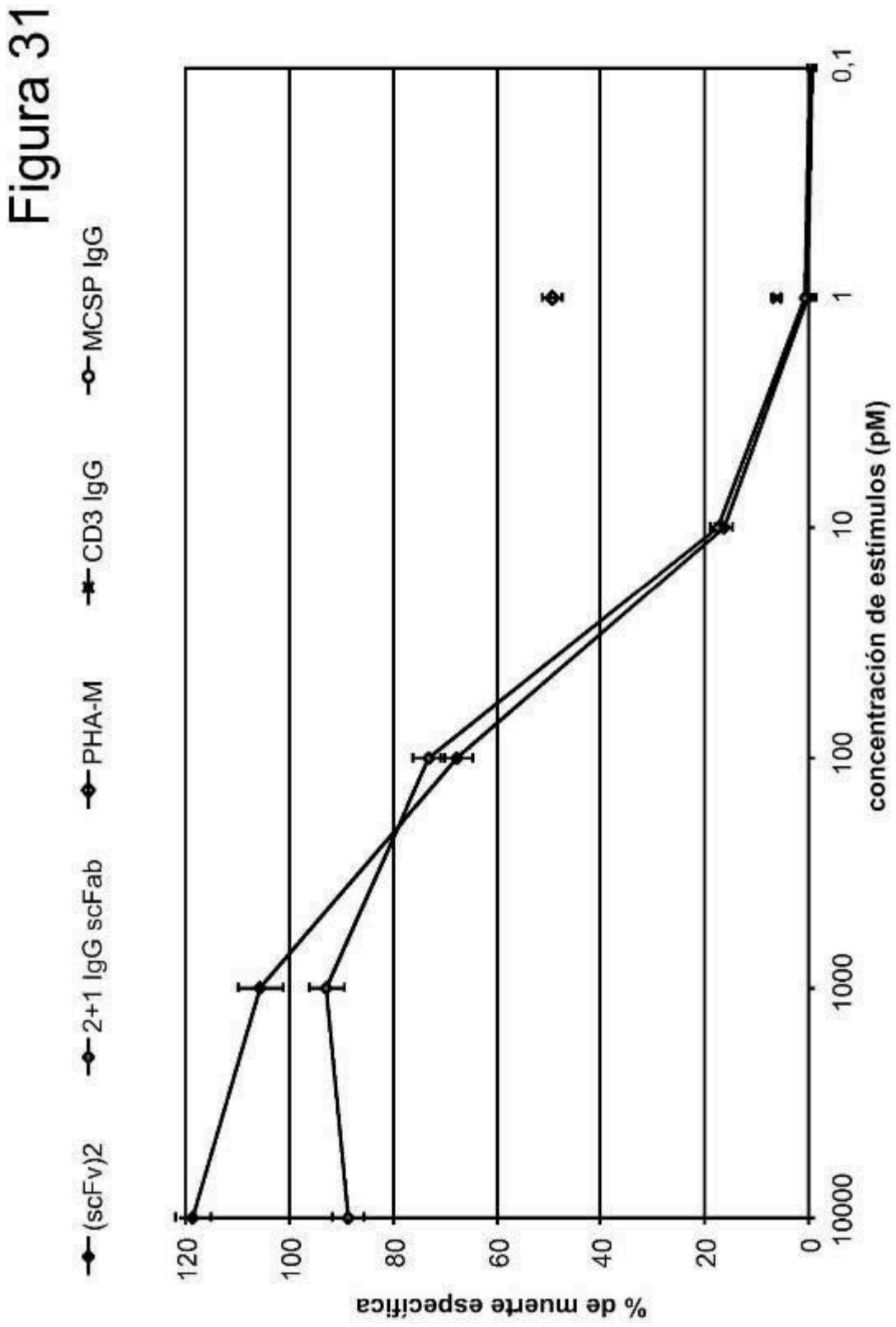

(scFv)2
2+1 IgG scFab
PHA-M
CD3 IgG
MCSP IgG
% de muerte específica
120
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
concentración de estímulos (pM)

Figura 32

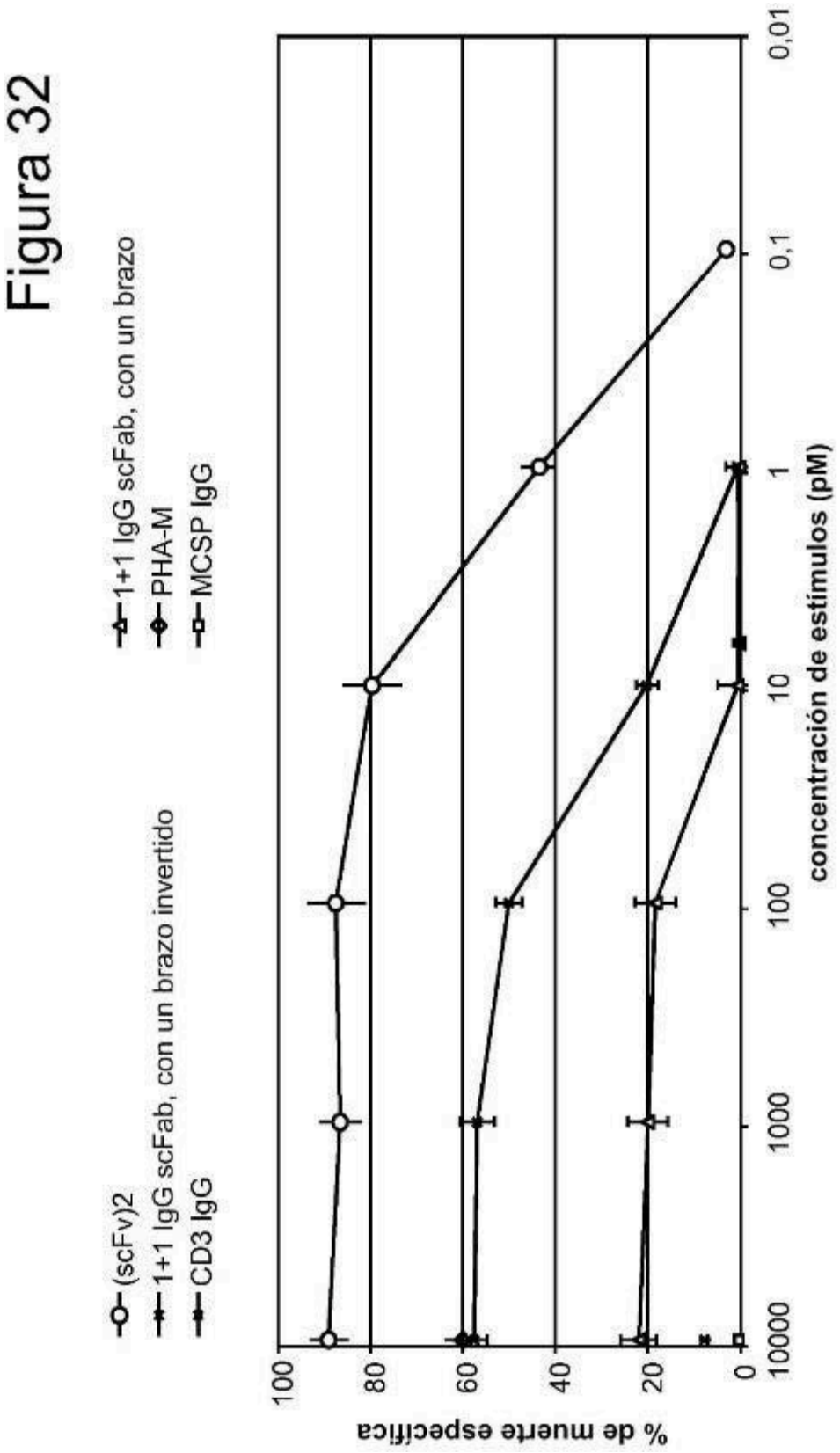

(scFv)2
1+1 IgG scFab, con un brazo invertido
CD3 IgG
1+1 IgG scFab, con un brazo
PHA-M
MCSP IgG
% de muerte específica
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
concentración de estímulos (pM)

Figura 33

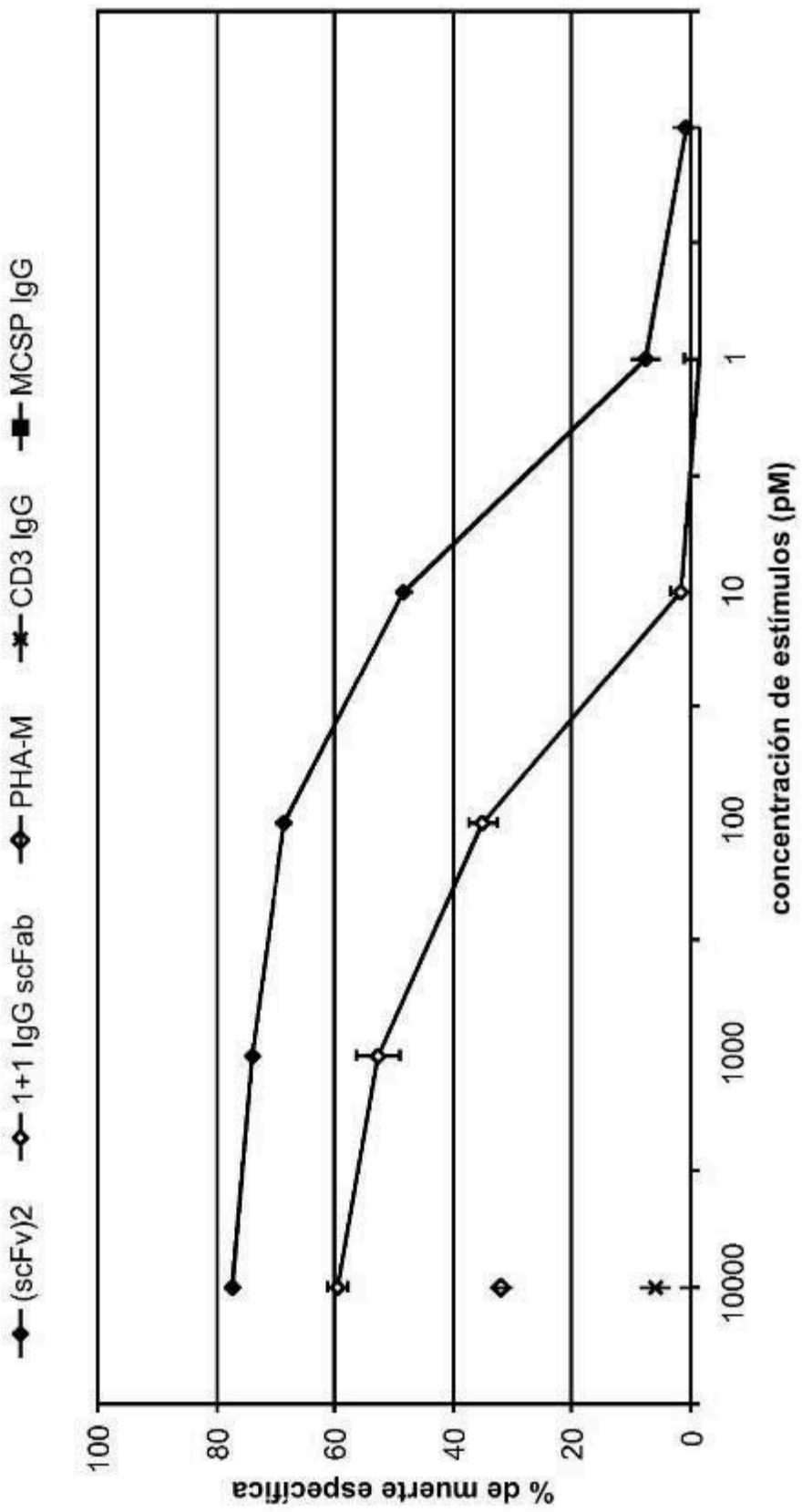

(scFv)2
1+1 IgG scFab
PHA-M
CD3 IgG
MCSP IgG
% de muerte específica
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
concentración de estímulos (pM)

Figura 34

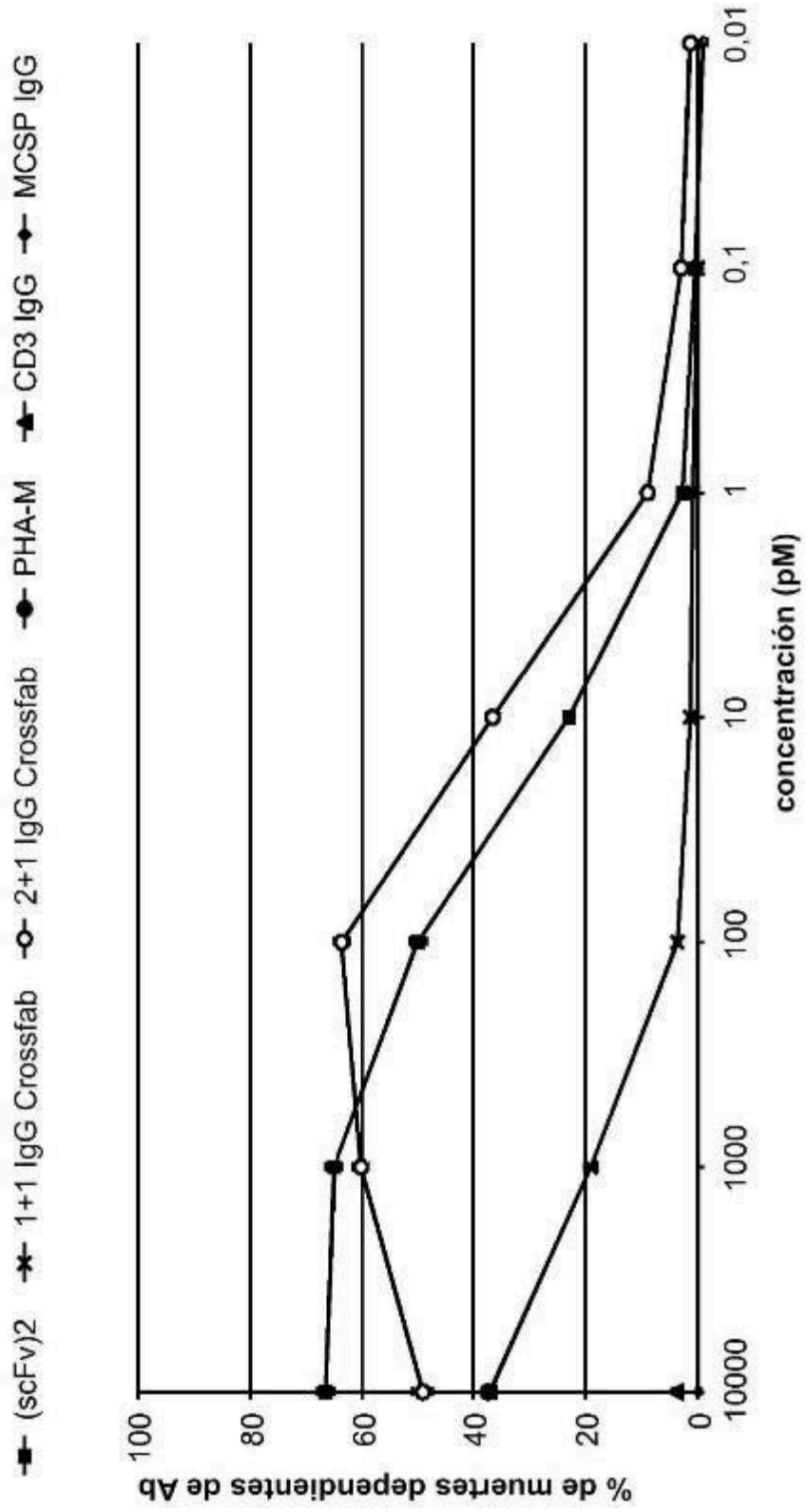

(scFv)2
1+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab
PHA-M
CD3 IgG
MCSP IgG
% de muertes dependientes de Ab
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
concentración (pM)

Figura 35

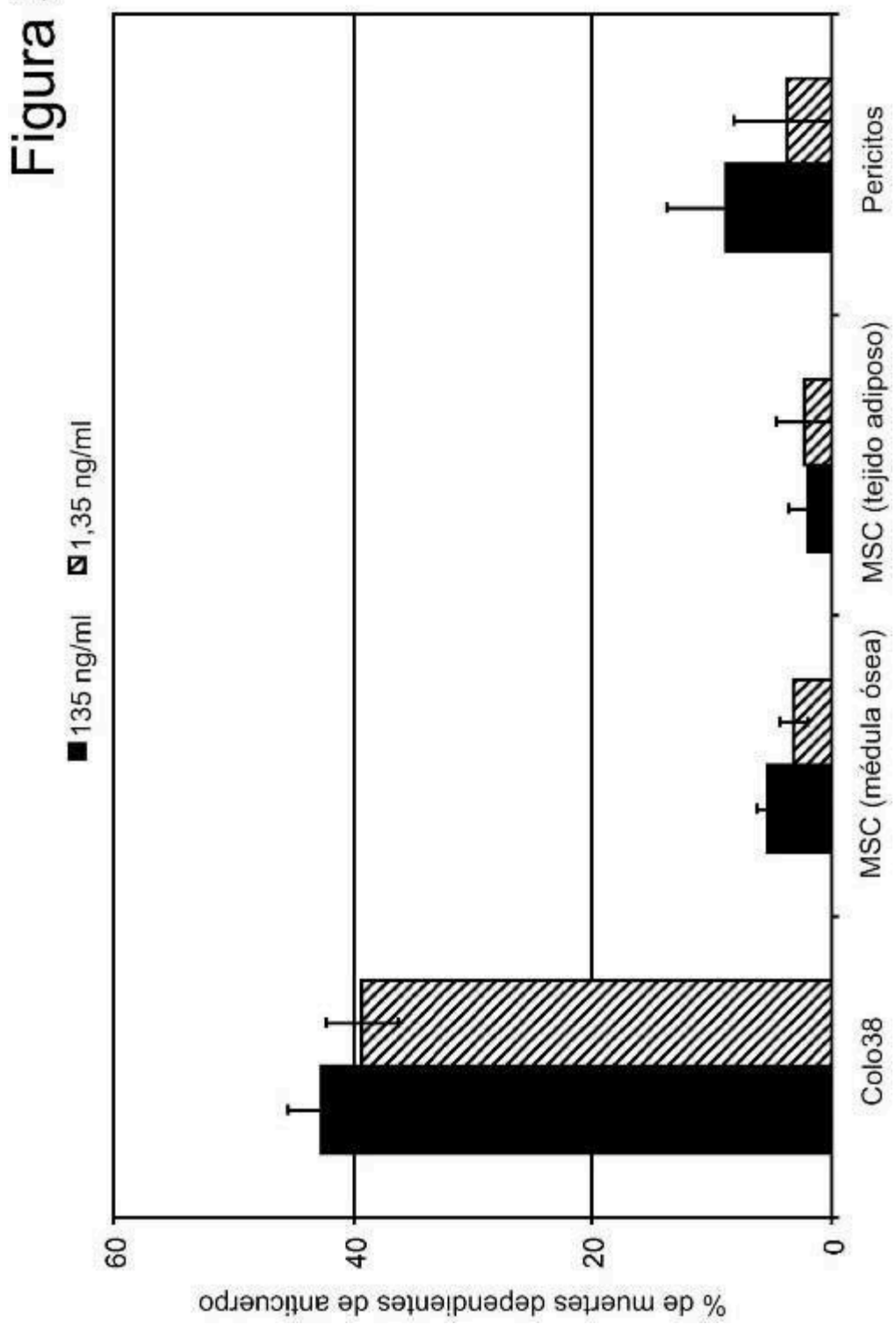

135 ng/ml
1,35 ng/ml
% de muertes dependientes de anticuerpo
60
40
20
0
Colo38
MSC (médula ósea)
MSC (tejido adiposo)
Pericitos

Figura 36

A

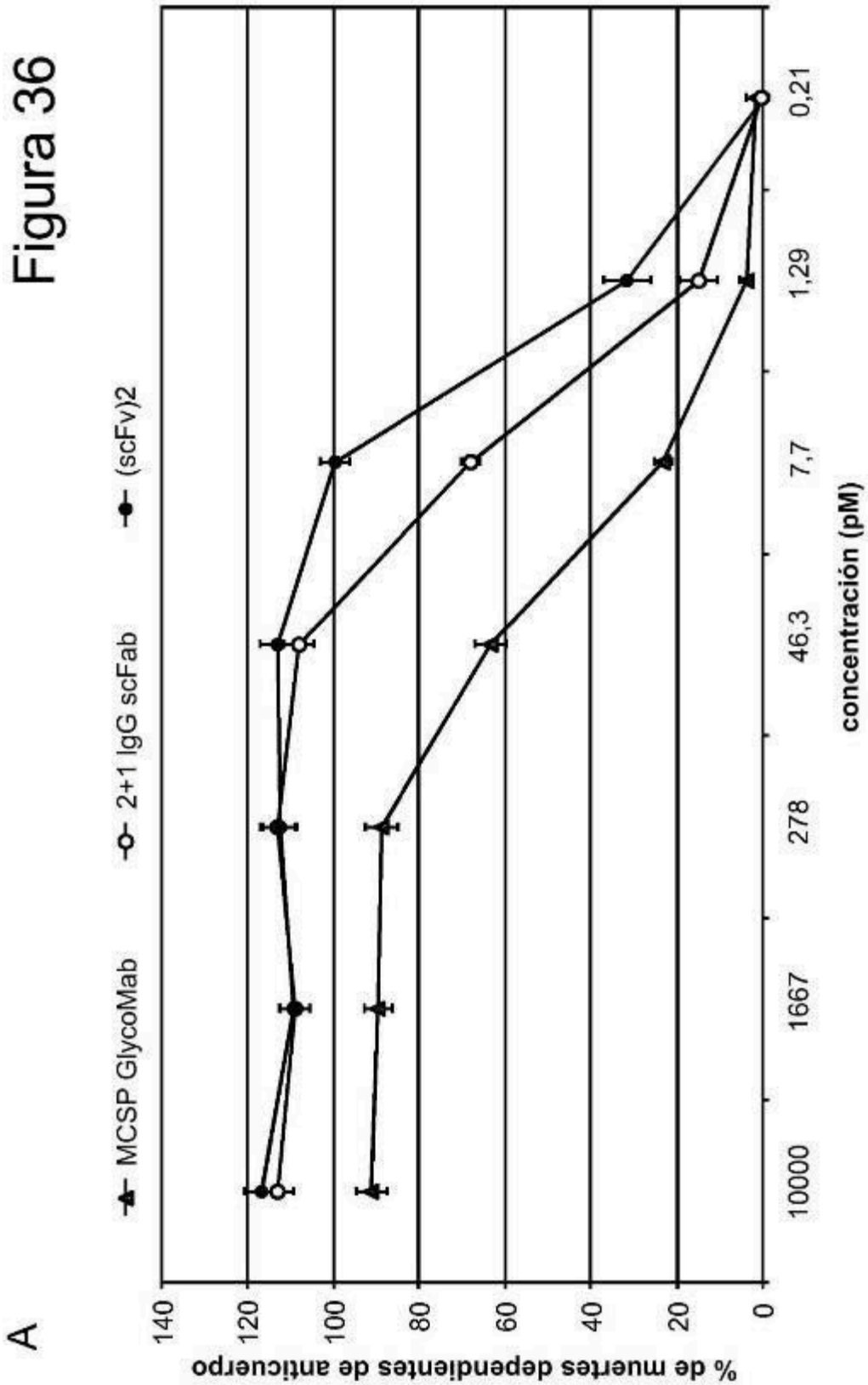

MCSP GlycoMab
2+1 IgG scFab
(scFv)2
% de muertes dependientes de anticuerpo
140
120
100
80
60
40
20
0
10000
1667
278
46,3
7,7
1,29
0,21
concentración (pM)

Figura 36

B

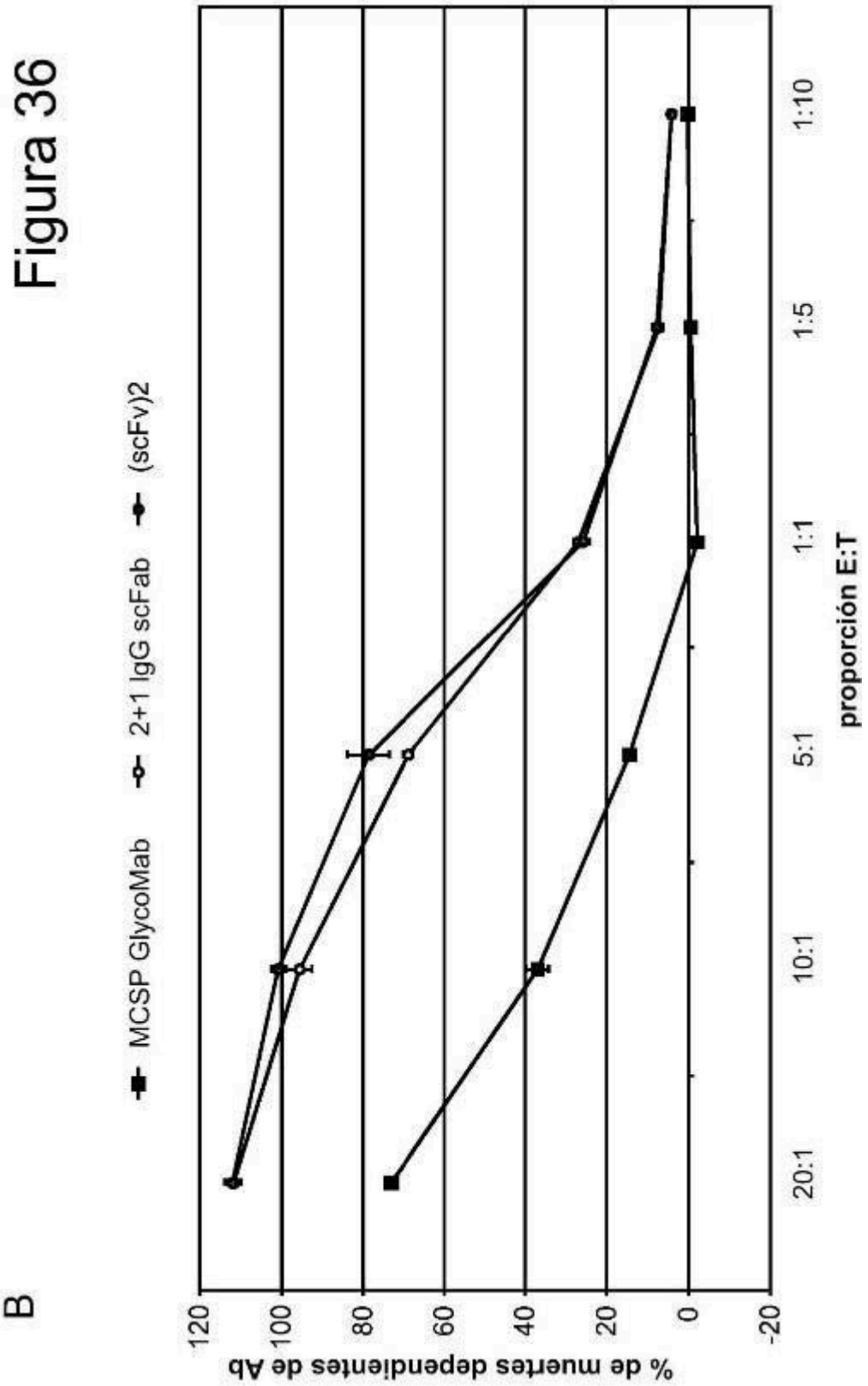

MCSP GlycoMab
2+1 IgG scFab
(scFv)2
% de muertes dependientes de Ab
120
100
80
60
40
20
0
-20
20:1
10:1
5:1
1:1
1:5
1:10
proporción E:T

Figura 37

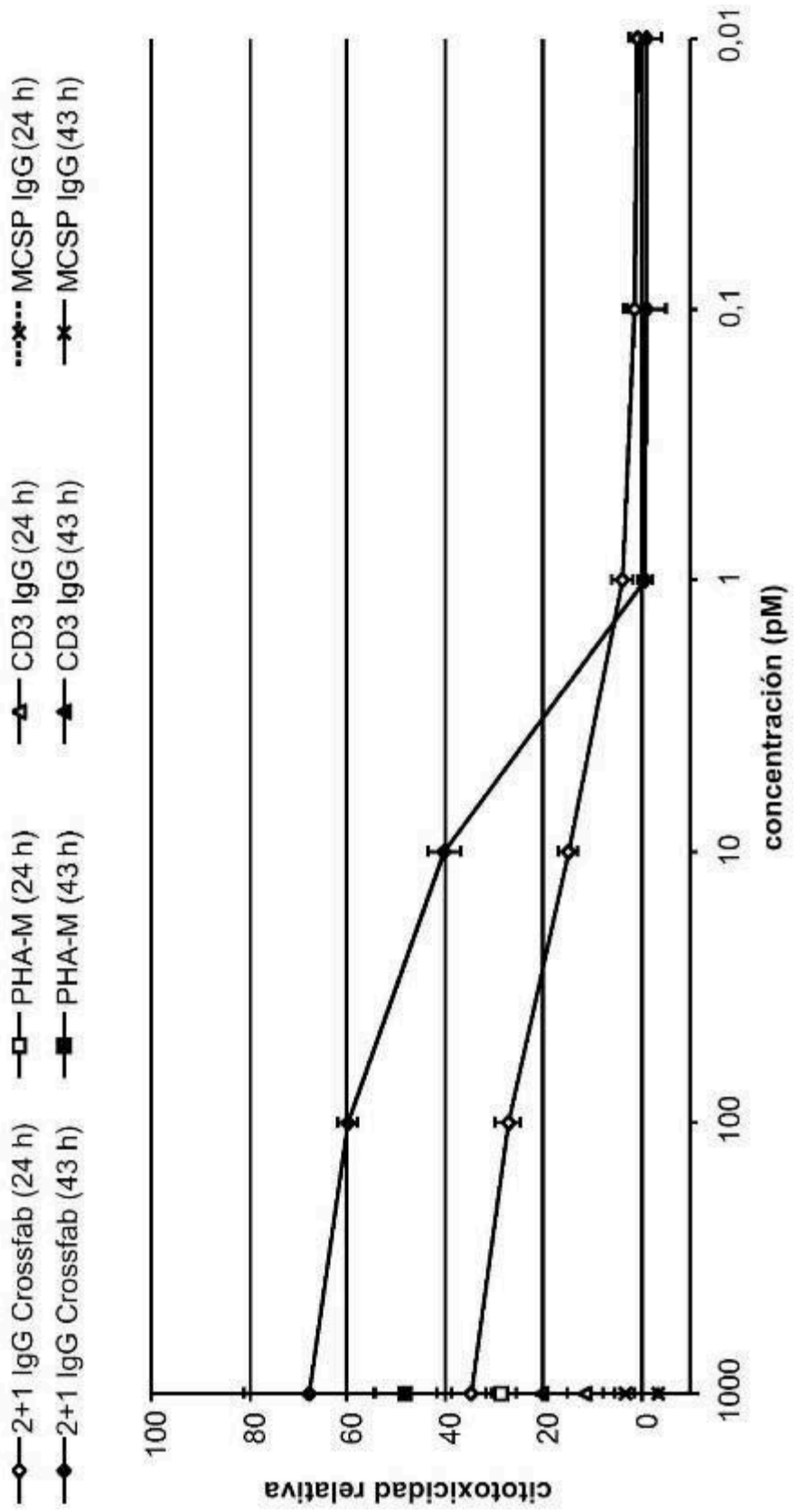

2+1 IgG Crossfab (24 h)
2+1 IgG Crossfab (43 h)
PHA-M (24 h)
PHA-M (43 h)
CD3 IgG (24 h)
CD3 IgG (43 h)
MCSP IgG (24 h)
MCSP IgG (43 h)
citotoxicidad relativa
100
80
60
40
20
0
1000
100
10
1
0,1
0,01
concentración (pM)

Figura 38

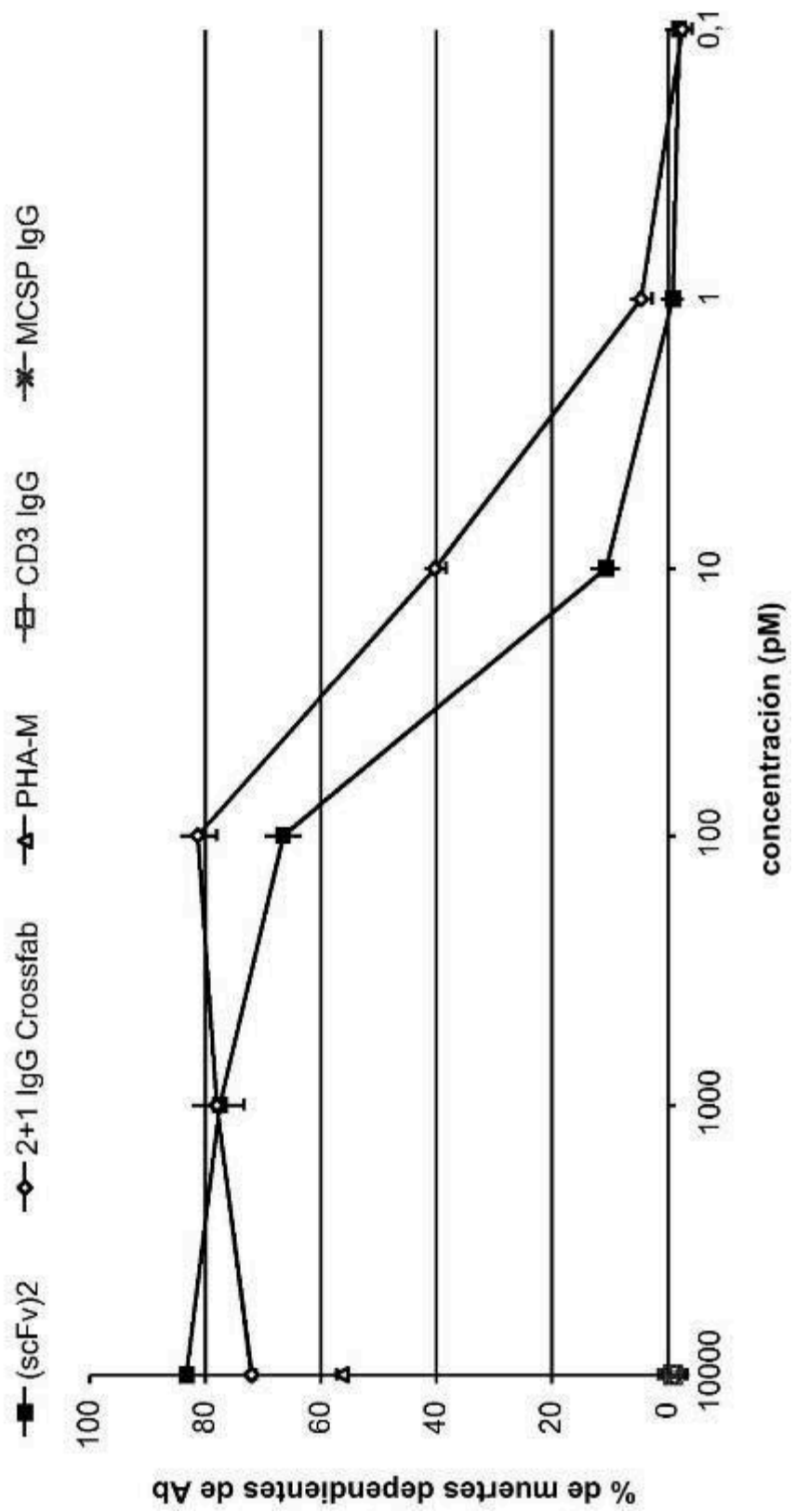

(scFv)2
2+1 IgG Crossfab
PHA-M
CD3 IgG
MCSP IgG
% de muertes dependientes de Ab
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
concentración (pM)

Figura 39

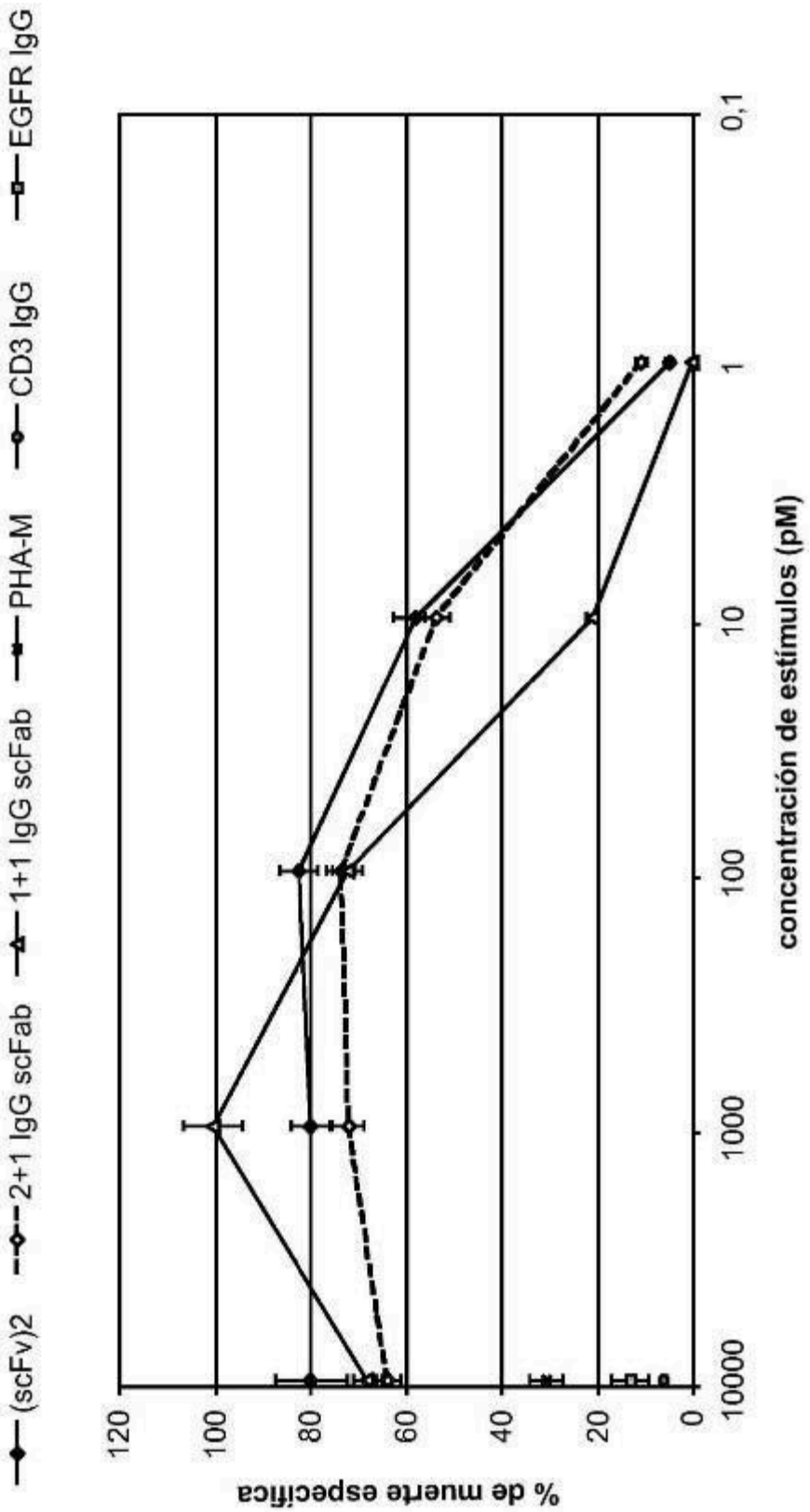

(scFv)2
2+1 IgG scFab
1+1 IgG scFab
PHA-M
CD3 IgG
EGFR IgG
% de muerte específica
120
100
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
concentración de estímulos (pM)

Figura 40

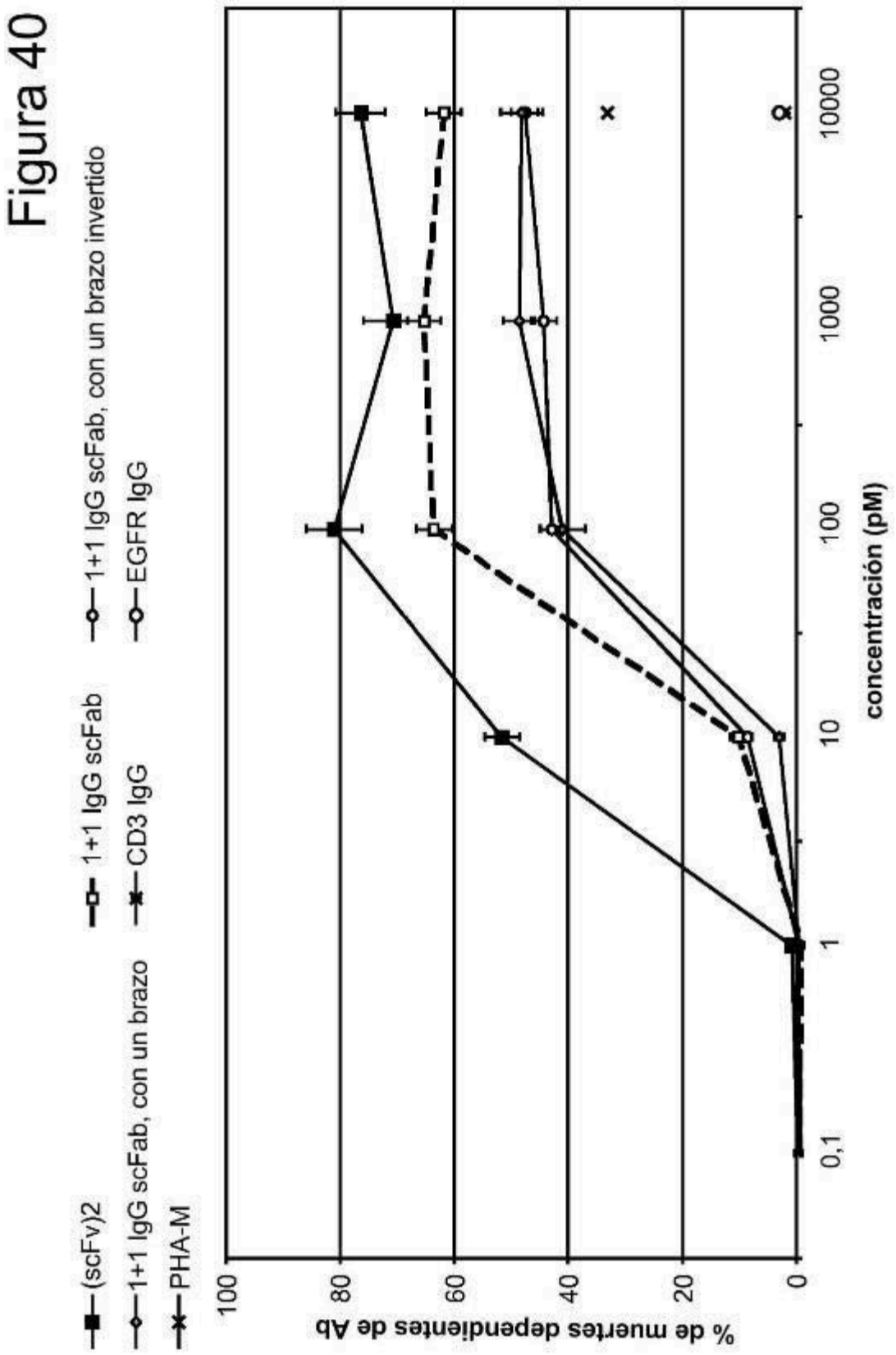

(scFv)2
1+1 IgG scFab
1+1 IgG scFab, con un brazo invertido
1+1 IgG scFab, con un brazo
CD3 IgG
EGFR IgG
PHA-M
% de muertes dependientes de Ab
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
1000
10000
concentración (pM)

Figura 41

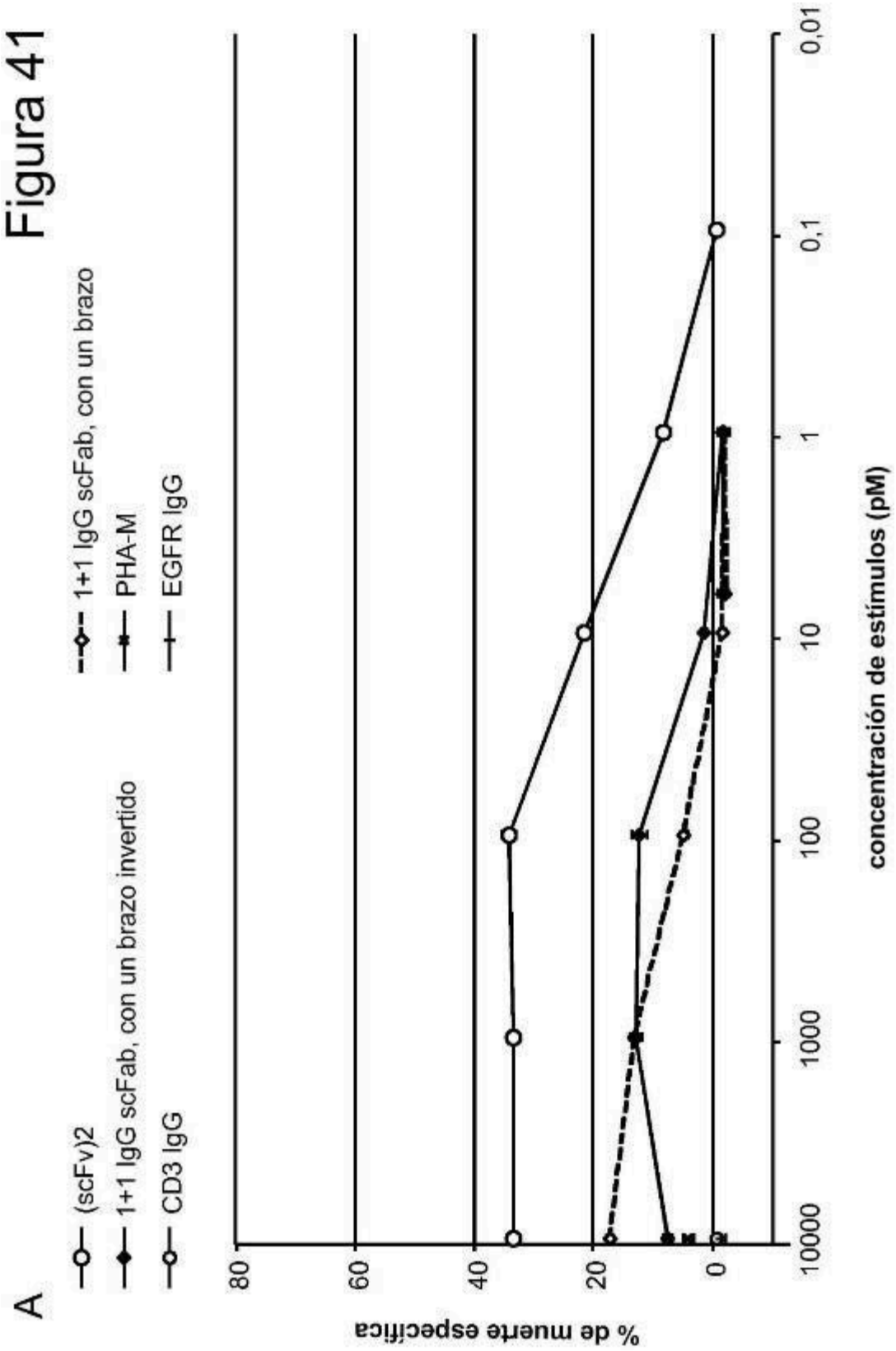

A
(scFv)2
1+1 IgG scFab, con un brazo invertido
CD3 IgG
1+1 IgG scFab, con un brazo
PHA-M
EGFR IgG
% de muerte específica
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
concentración de estímulos (pM)

Figura 41

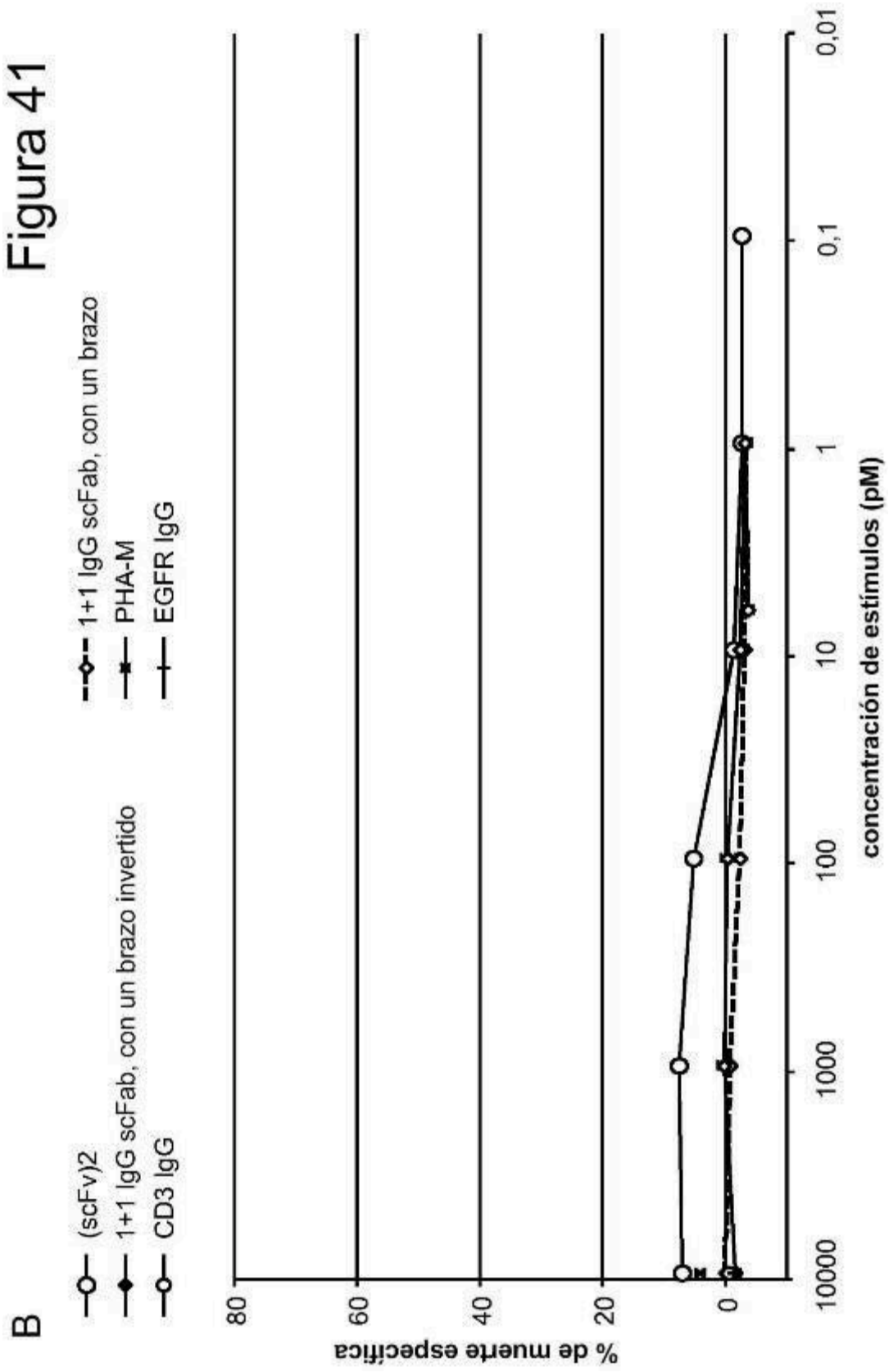
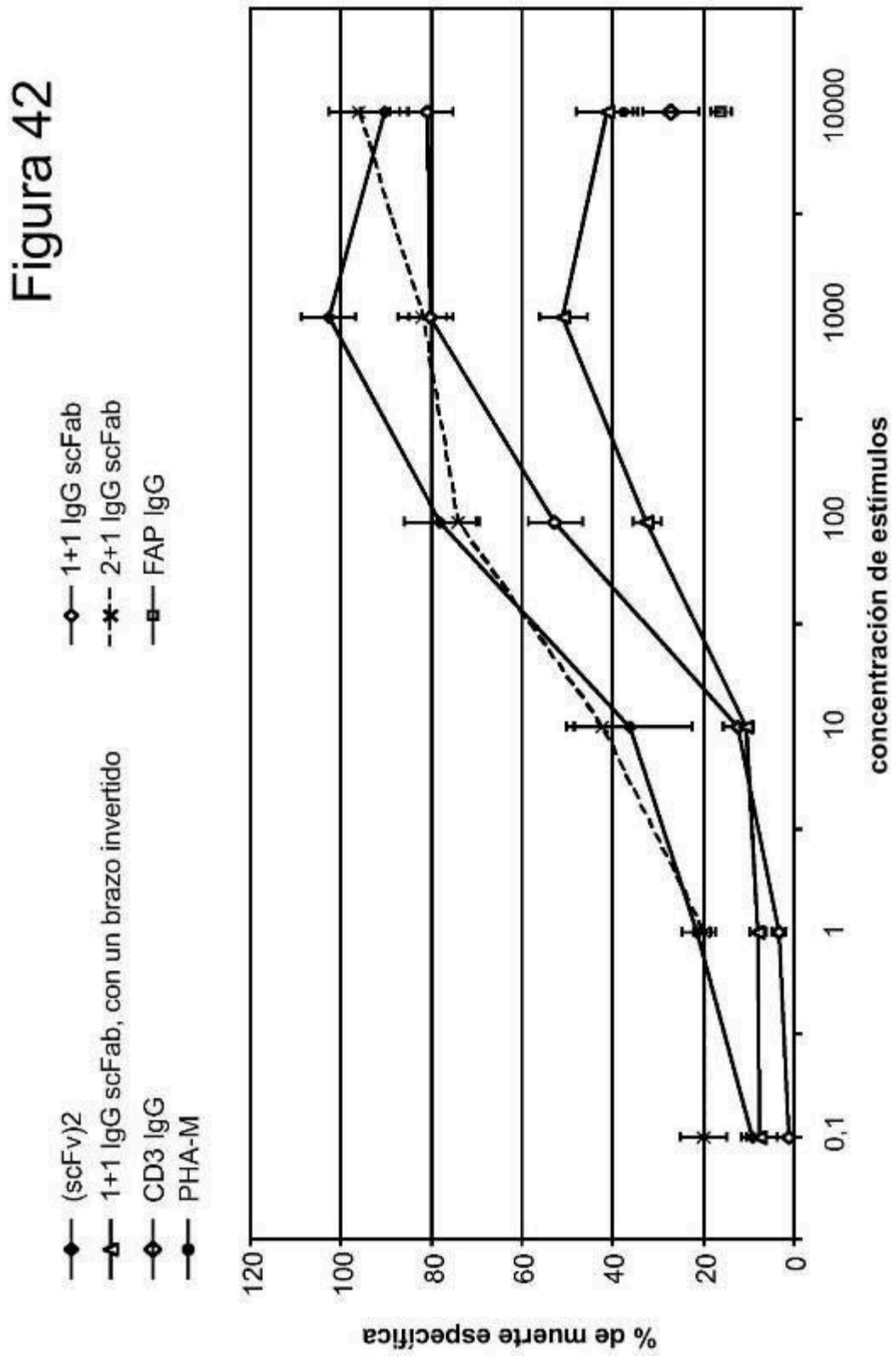

B
(scFv)2
1+1 IgG scFab, con un brazo invertido
CD3 IgG
1+1 IgG scFab, con un brazo
PHA-M
EGFR IgG
% de muerte específica
80
60
40
20
0
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
concentración de estímulos (pM)

Figura 42


(scFv)2
1+1 IgG scFab, con un brazo invertido
CD3 IgG
PHA-M
1+1 IgG scFab
2+1 IgG scFab
FAP IgG
% de muerte específica
0
20
40
60
80
100
120
0,1
1
10
100
1000
10000
concentración de estímulos

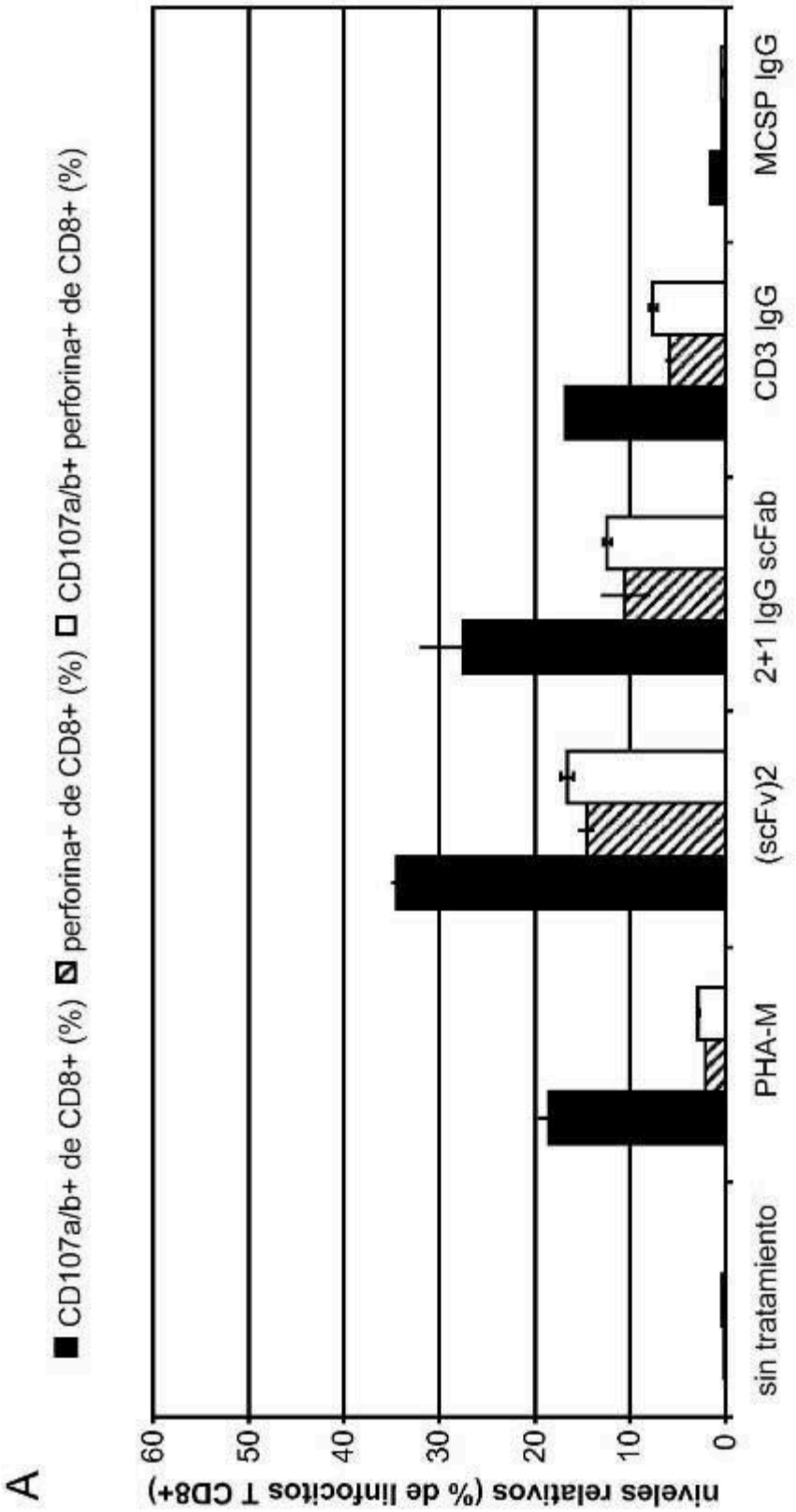

A
■ CD107a/b+ de CD8+ (%) ⊠ perforina+ de CD8+ (%) □ CD107a/b+ perforina+ de CD8+ (%)
niveles relativos (% de linfocitos T CD8+)
0
10
20
30
40
50
60
sin tratamiento
PHA-M
(scFv)2
2+1 IgG scFab
CD3 IgG
MCSP IgG

Figura 43

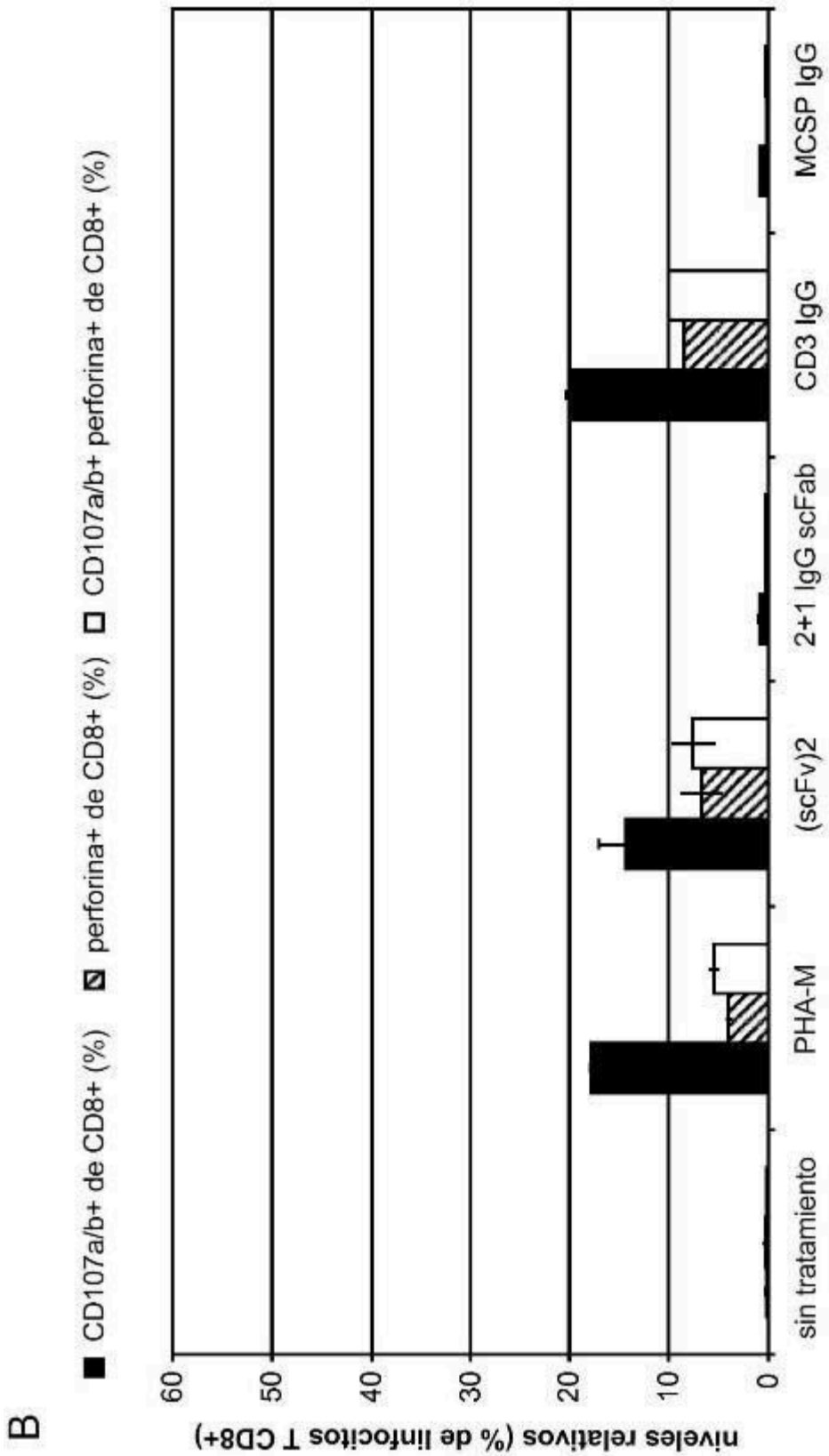

B
CD107a/b+ de CD8+ (%)
perforina+ de CD8+ (%)
CD107a/b+ perforina+ de CD8+ (%)
niveles relativos (% de linfocitos T CD8+)
60
50
40
30
20
10
0
sin tratamiento
PHA-M
(scFv)2
2+1 IgG scFab
CD3 IgG
MCSP IgG

Figura 43

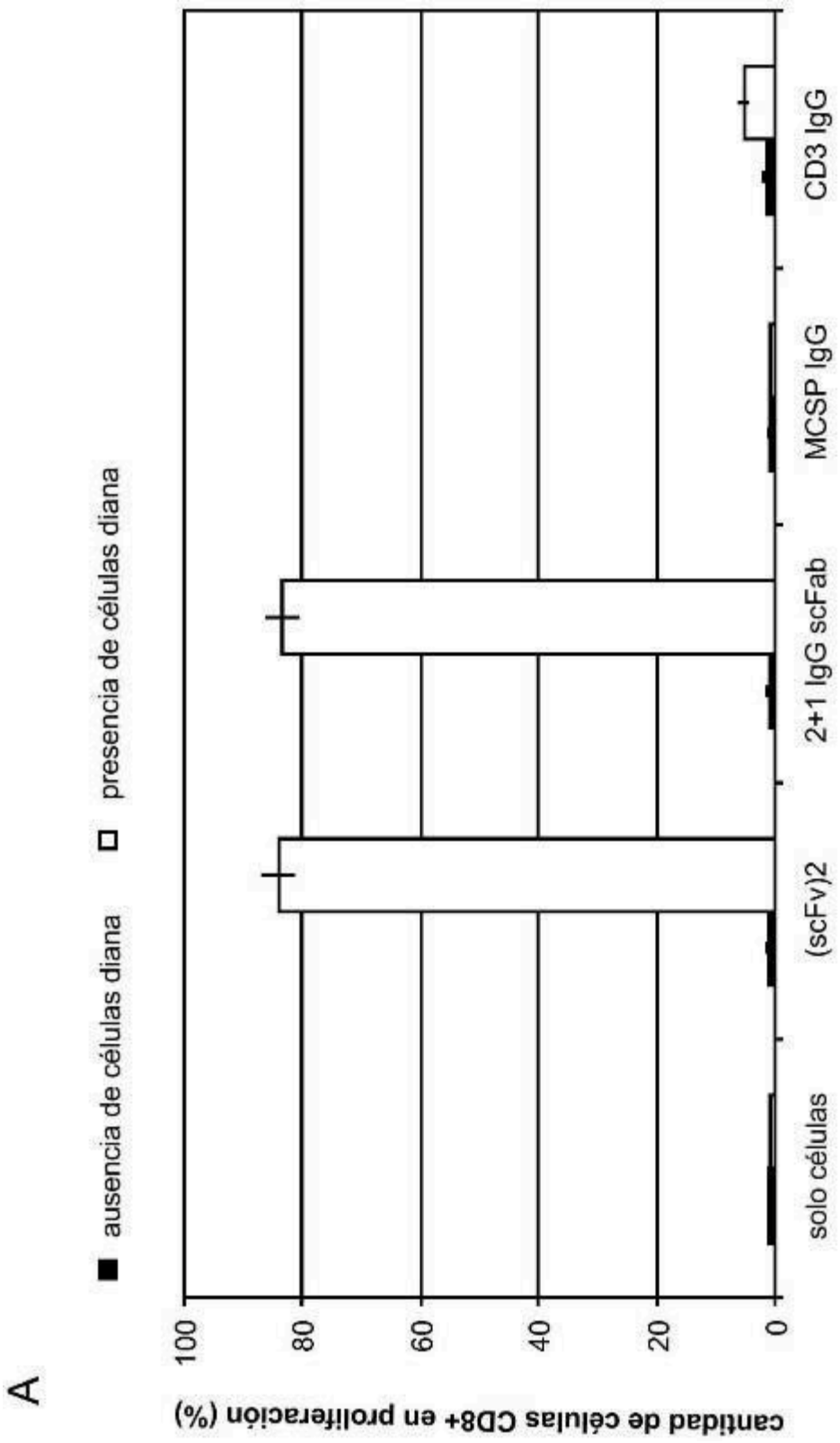

A
ausencia de células diana
presencia de células diana
cantidad de células CD8+ en proliferación (%)
100
80
60
40
20
0
solo células
(scFv)2
2+1 IgG scFab
MCSP IgG
CD3 IgG

Figura 44

Figura 44

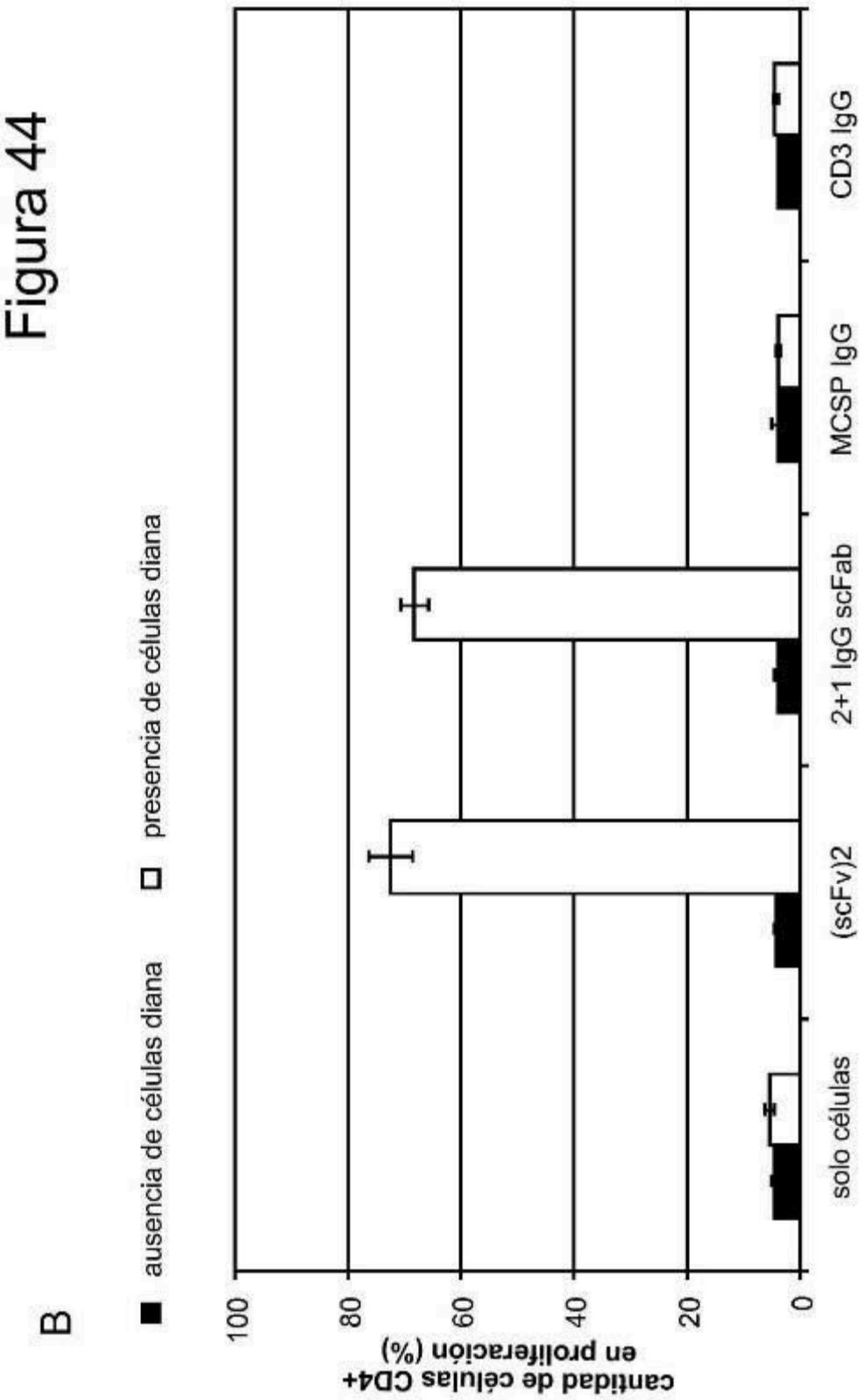

B
ausencia de células diana
presencia de células diana
cantidad de células CD4+ en proliferación (%)
100
80
60
40
20
0
solo células
(scFv)2
2+1 IgG scFab
MCSP IgG
CD3 IgG

Figura 45

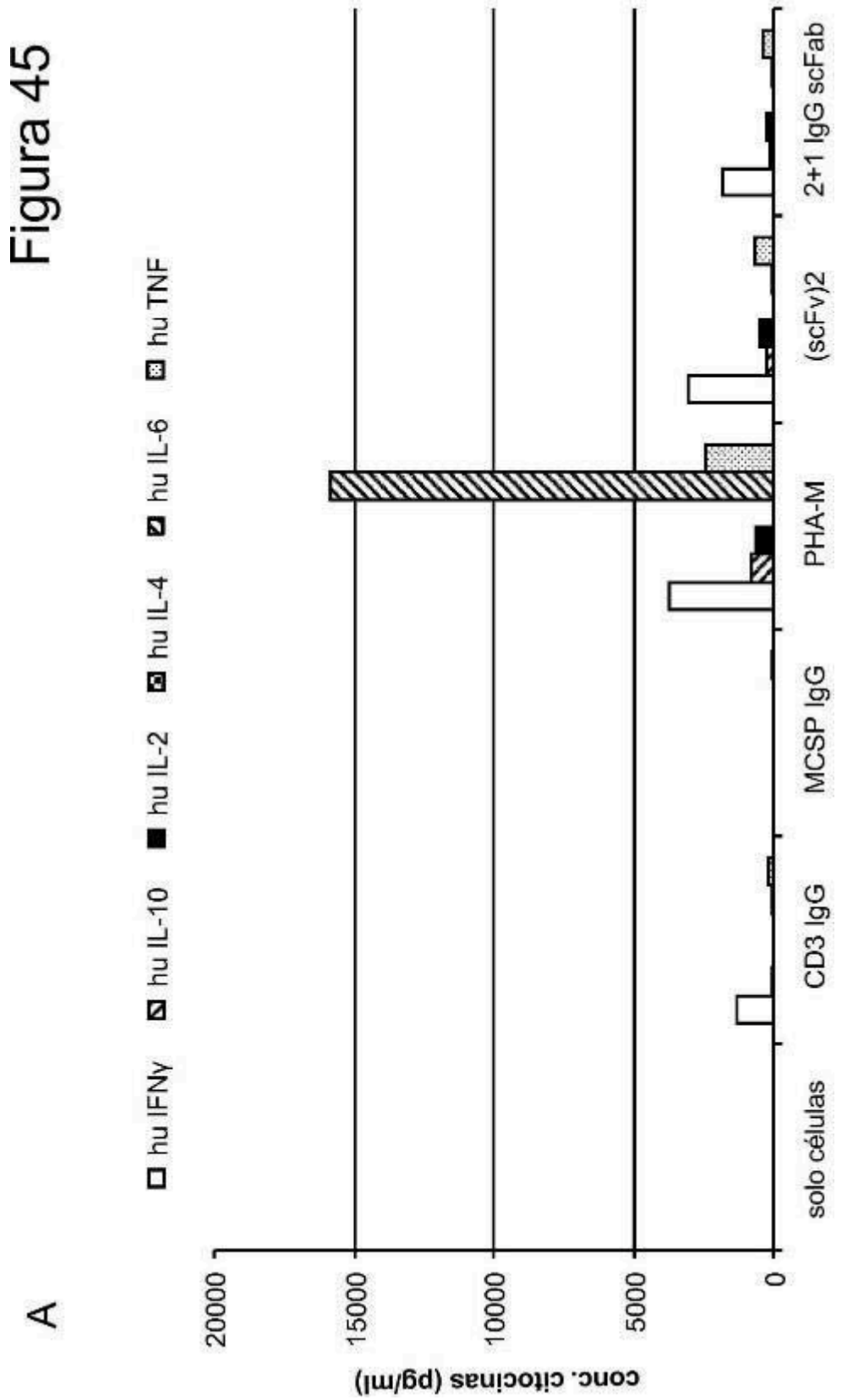
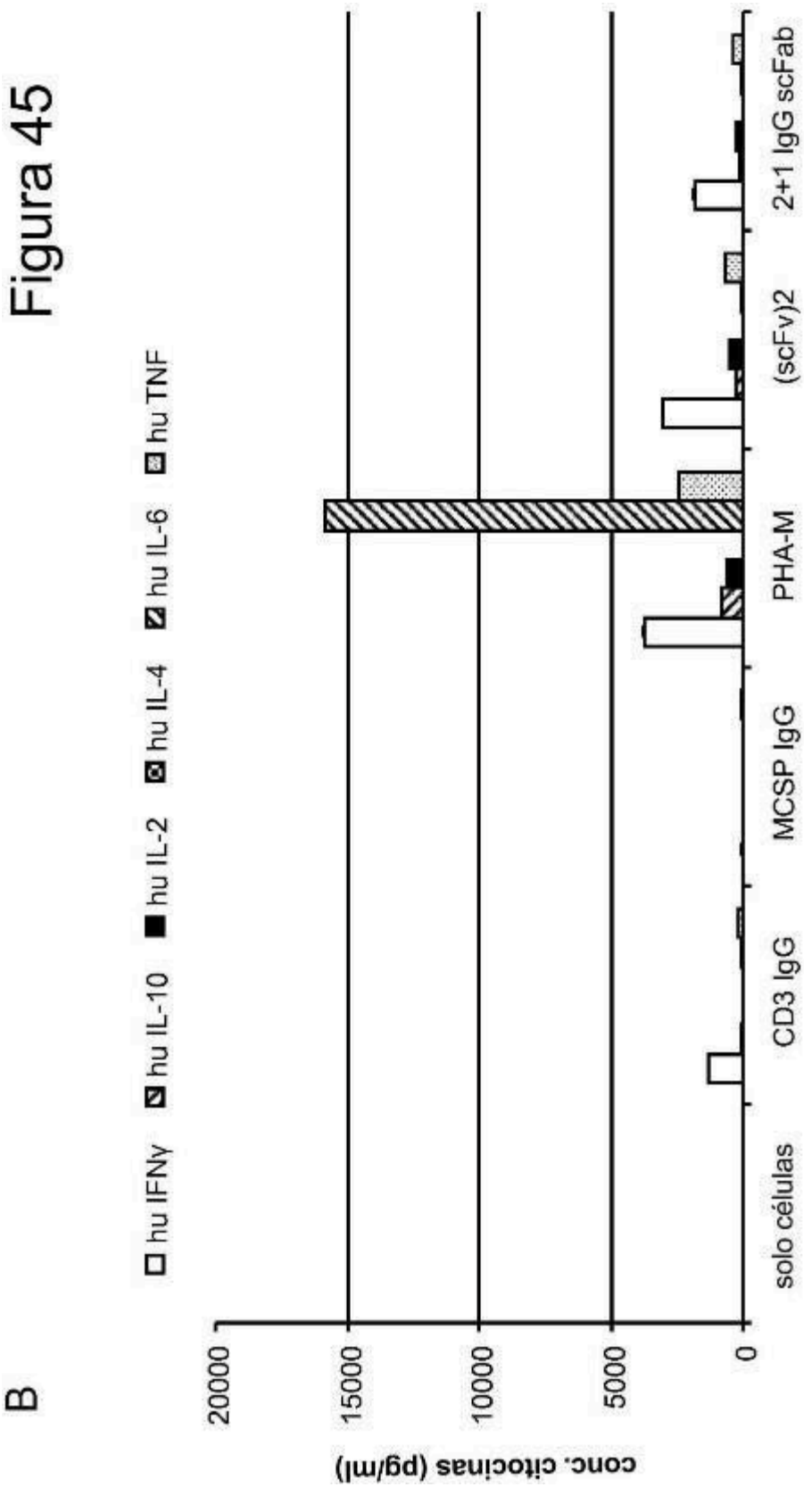

A
hu IFNγ
hu IL-10
hu IL-2
hu IL-4
hu IL-6
hu TNF
conc. citocinas (pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
solo células
CD3 IgG
MCSP IgG
PHA-M
(scFv)2
2+1 IgG scFab

Figura 45

B


hu IFNγ
hu IL-10
hu IL-2
hu IL-4
hu IL-6
hu TNF
conc. citocinas (pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
solo células
CD3 IgG
MCSP IgG
PHA-M
(scFv)2
2+1 IgG scFab

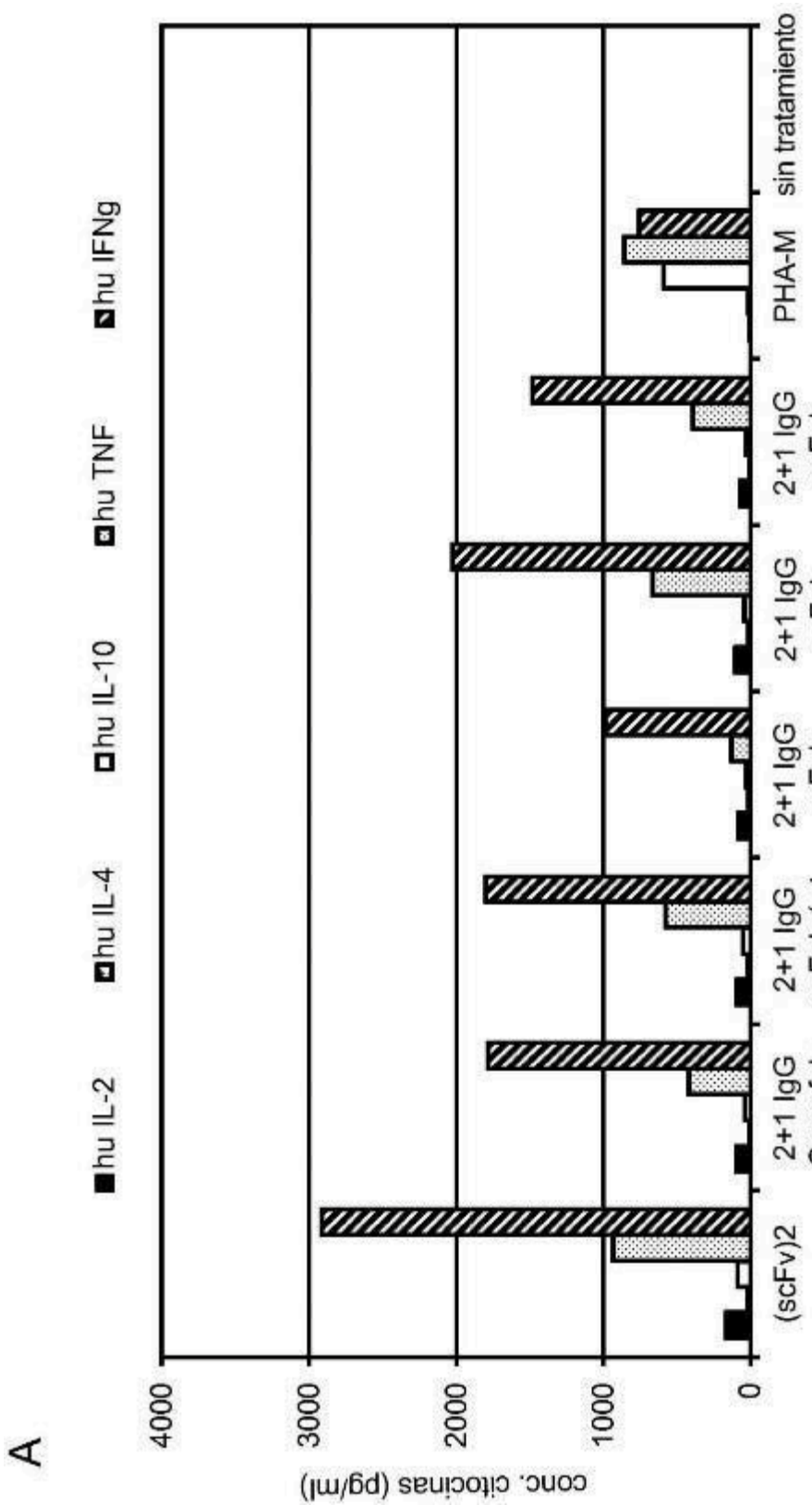

A
conc. citocinas (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
hu IL-2
hu IL-4
hu IL-10
hu TNF
hu IFNg
(scFv)2
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG scFab (wt Fc)
2+1 IgG scFab (LALA)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G, N297D)
PHA-M
sin tratamiento

Figura 46

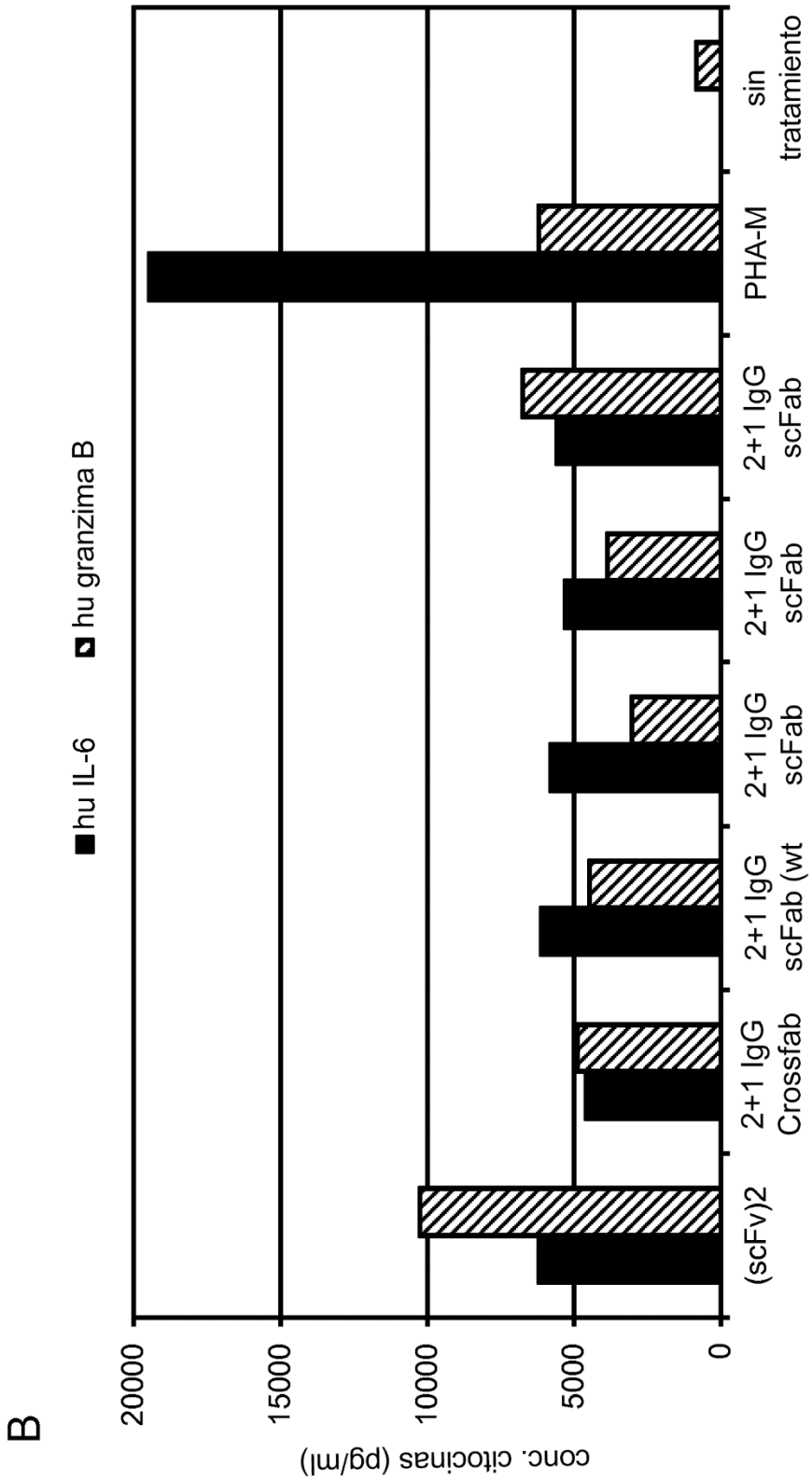

B
conc. citocinas (pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
hu IL-6
hu granzima B
(scFv)2
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG scFab (wt Fc)
2+1 IgG scFab (LALA)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G, N297D)
PHA-M
sin tratamiento

Figura 46

Figura 46

C

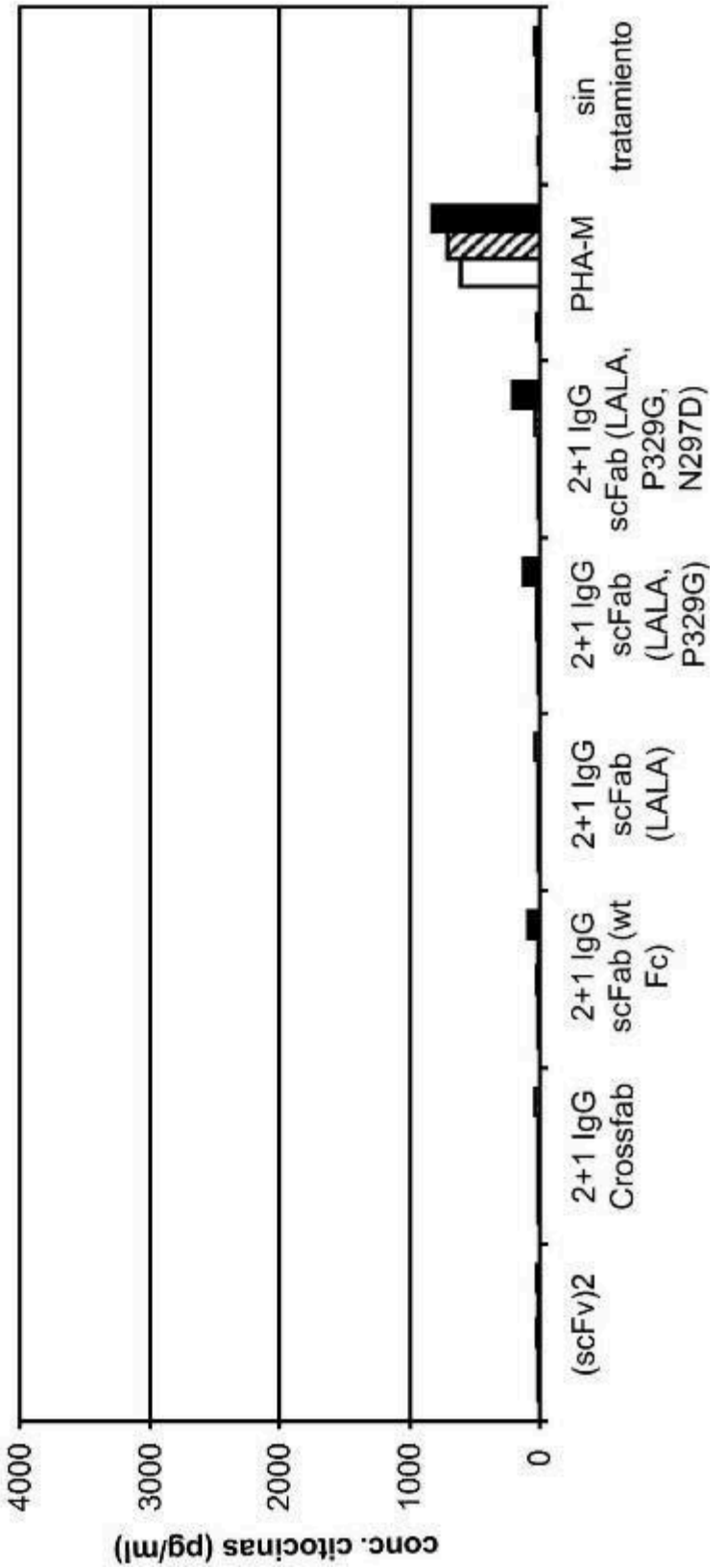
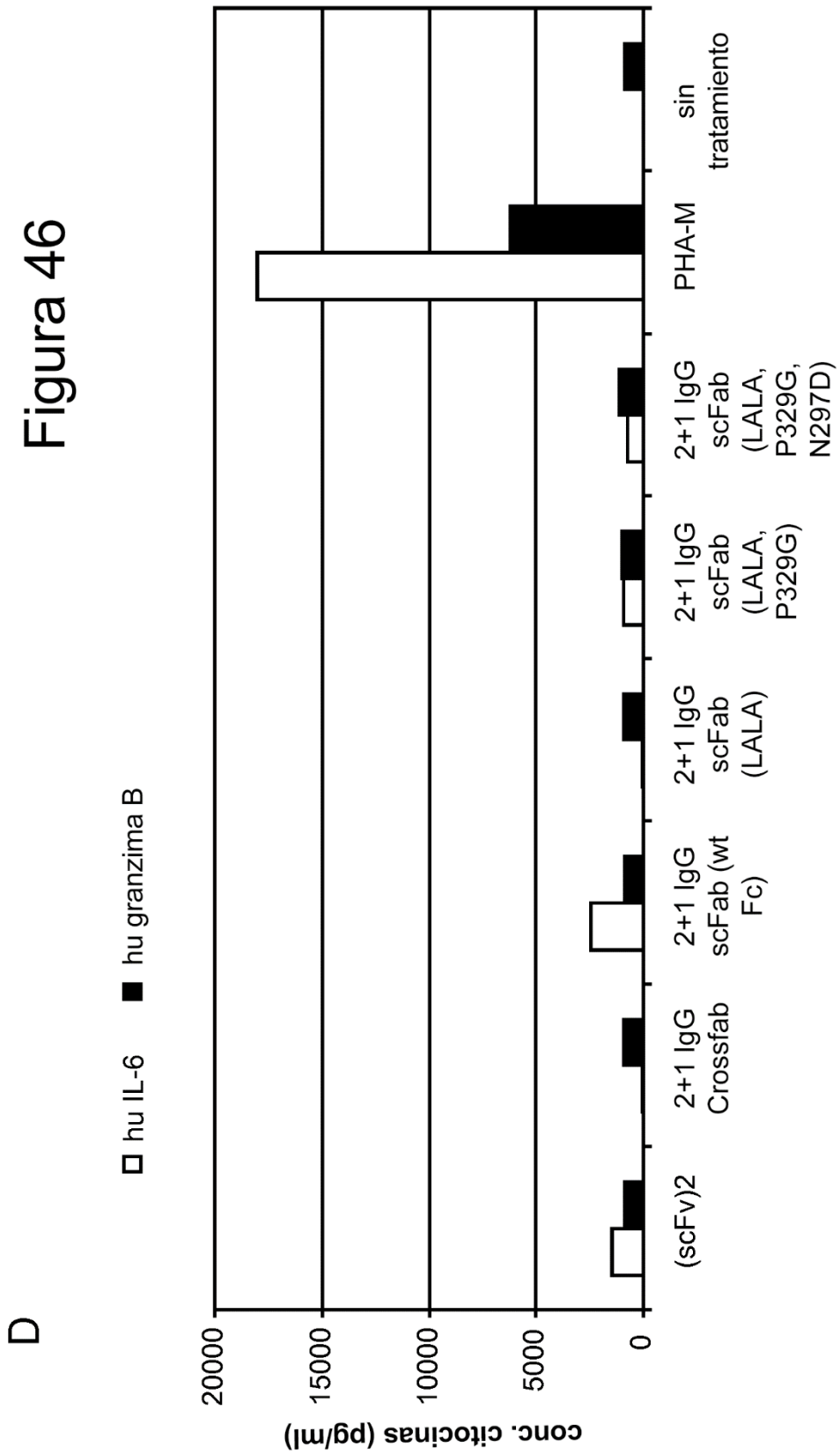

hu IL-2
hu IL-4
hu IL-10
hu TNF
hu IFNg
conc. citocinas (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
(scFv)2
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG scFab (wt Fc)
2+1 IgG scFab (LALA)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G, N297D)
PHA-M
sin tratamiento

Figura 46

D


hu IL-6
hu granzima B
conc. citocinas (pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
(scFv)2
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG scFab (wt Fc)
2+1 IgG scFab (LALA)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G)
2+1 IgG scFab (LALA, P329G, N297D)
PHA-M
sin tratamiento

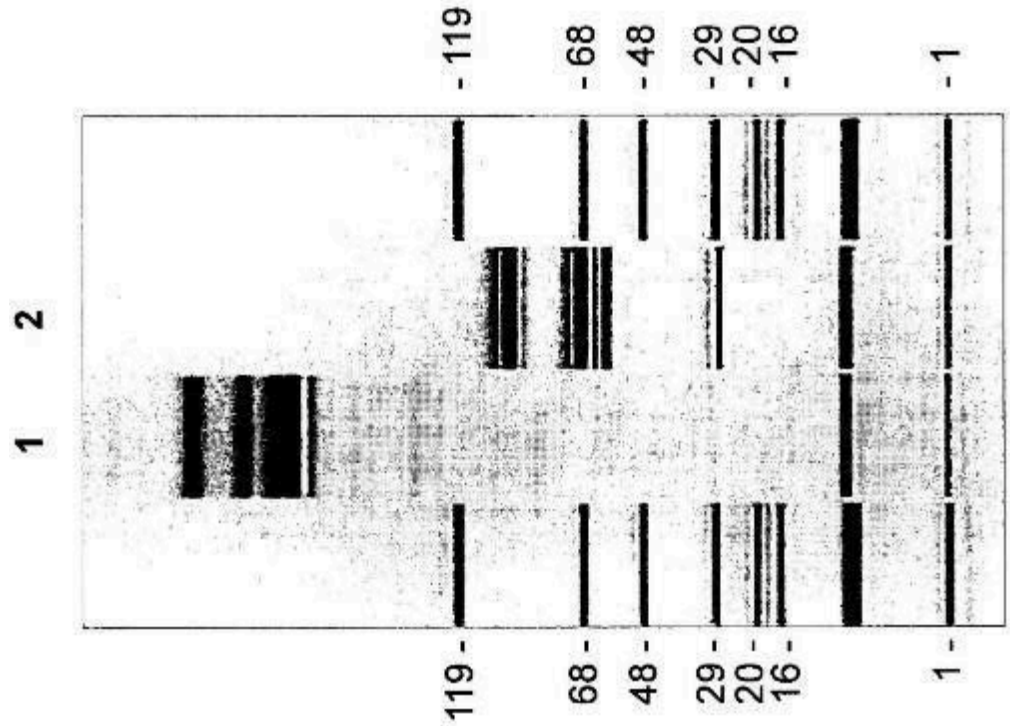
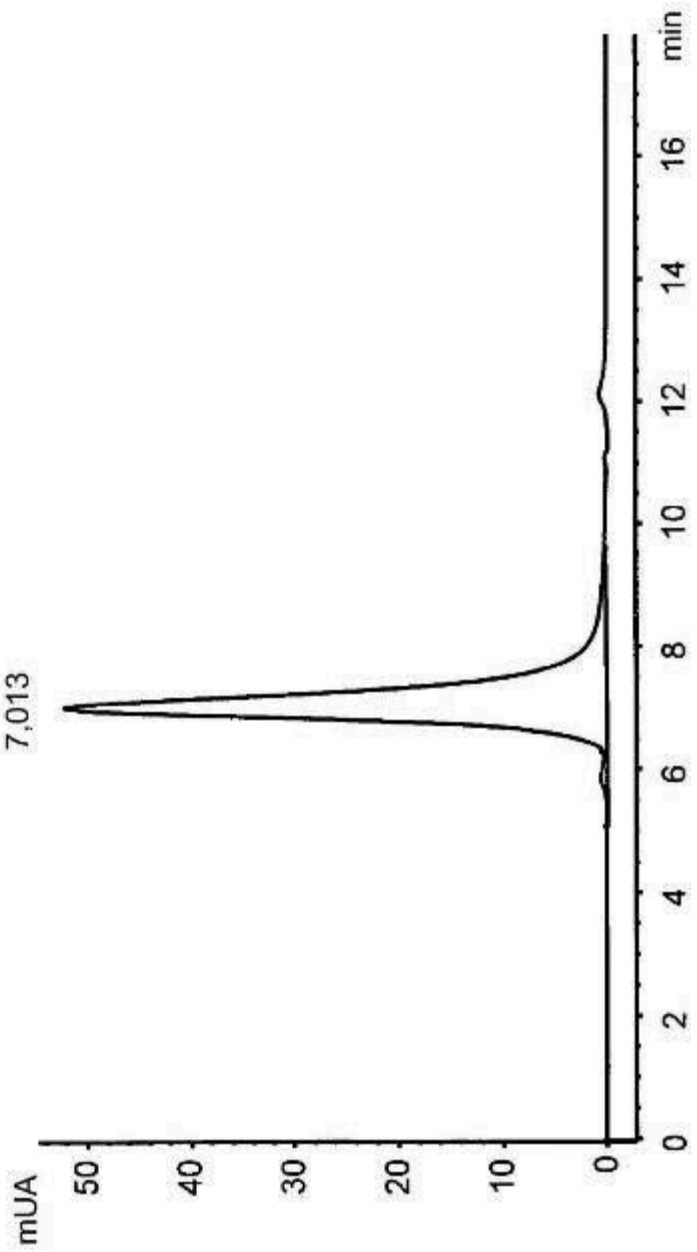


Figura 47

Figura 48



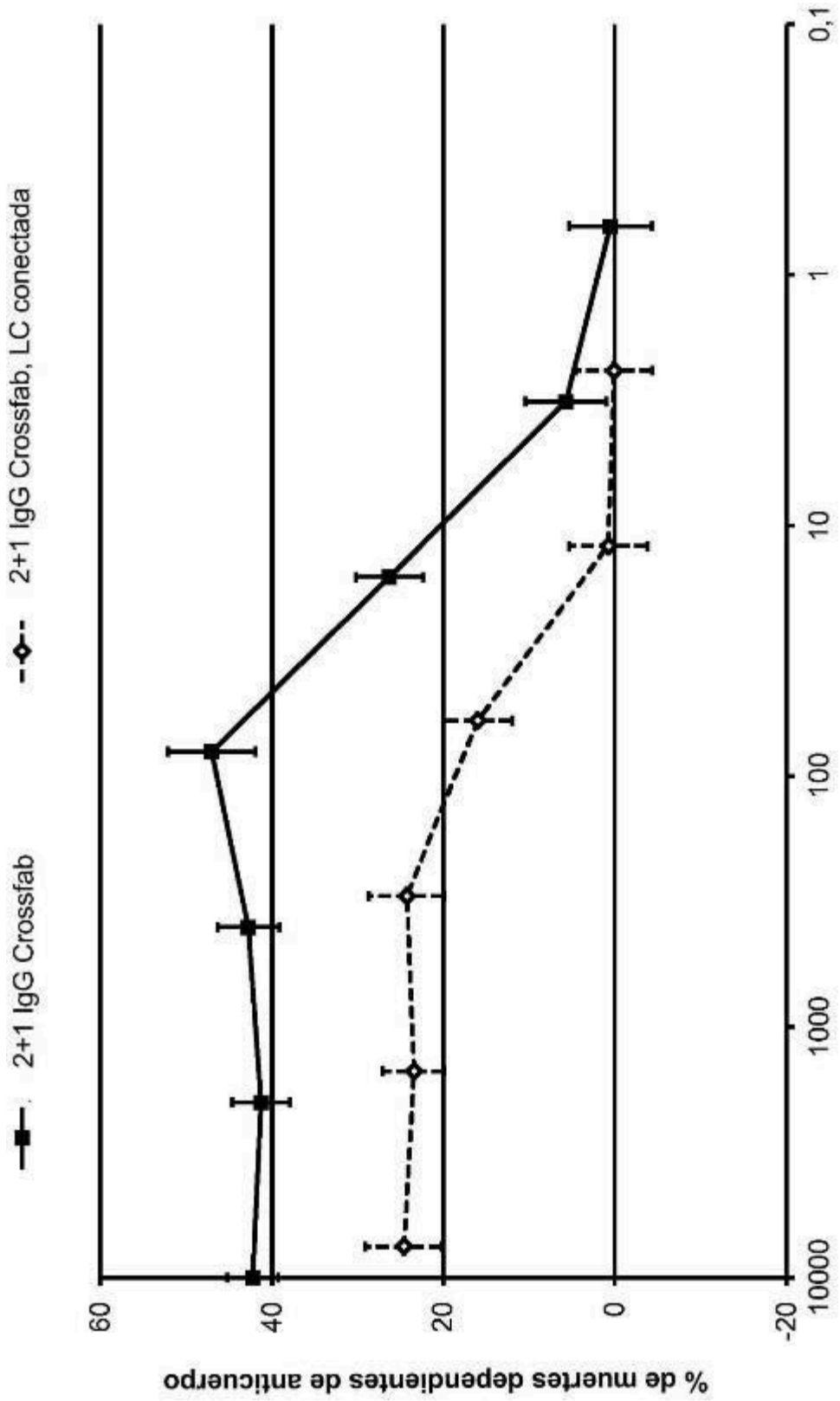

2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, LC conectada
% de muertes dependientes de anticuerpo
60
40
20
0
-20
0,1
1
10
100
1000
10000
concentración (pM)

Figura 49

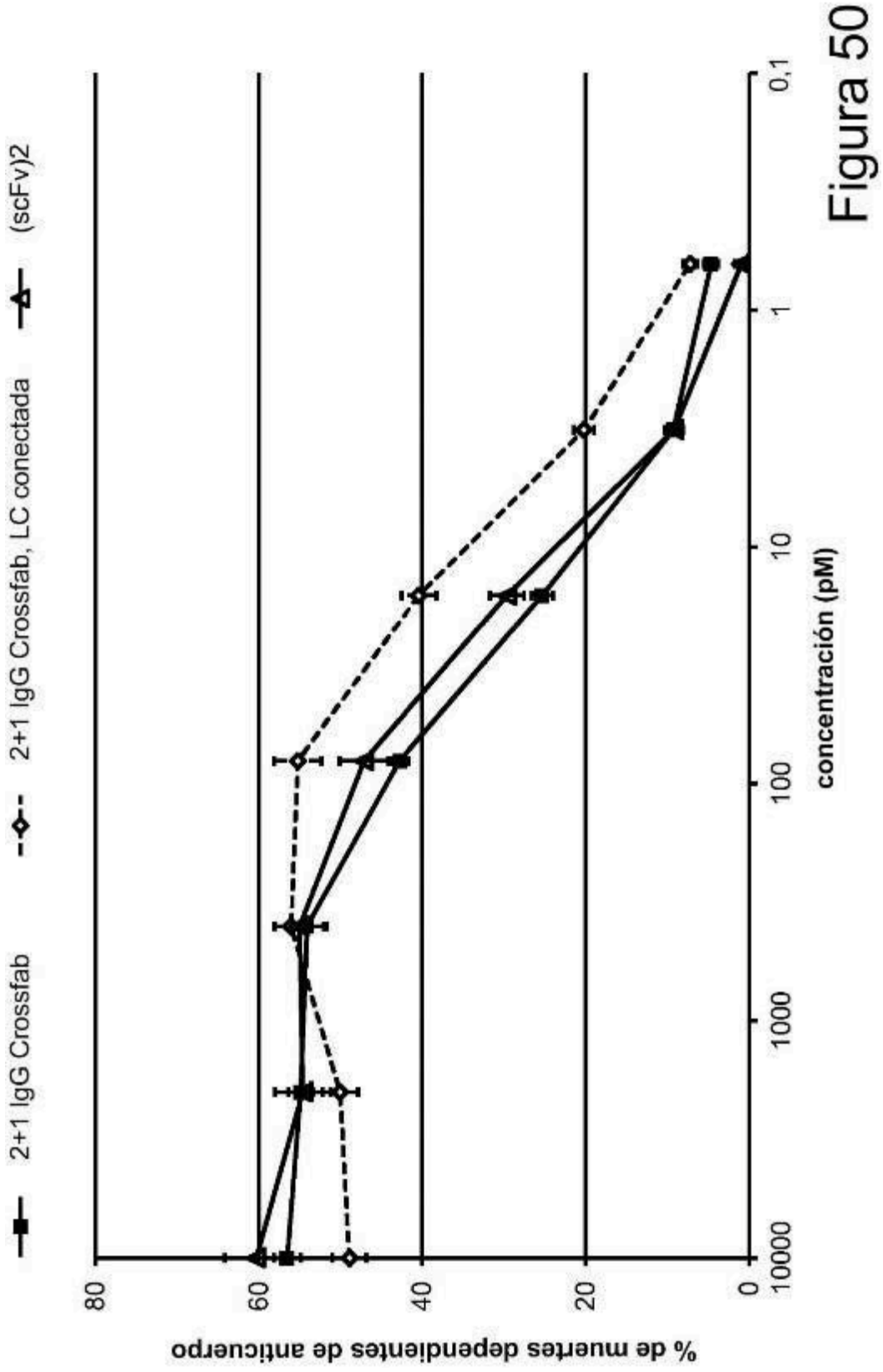

2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, LC conectada
(scFv)2
% de muertes dependientes de anticuerpo
0
20
40
60
80
concentración (pM)
0,1
1
10
100
1000
10000

Figura 50

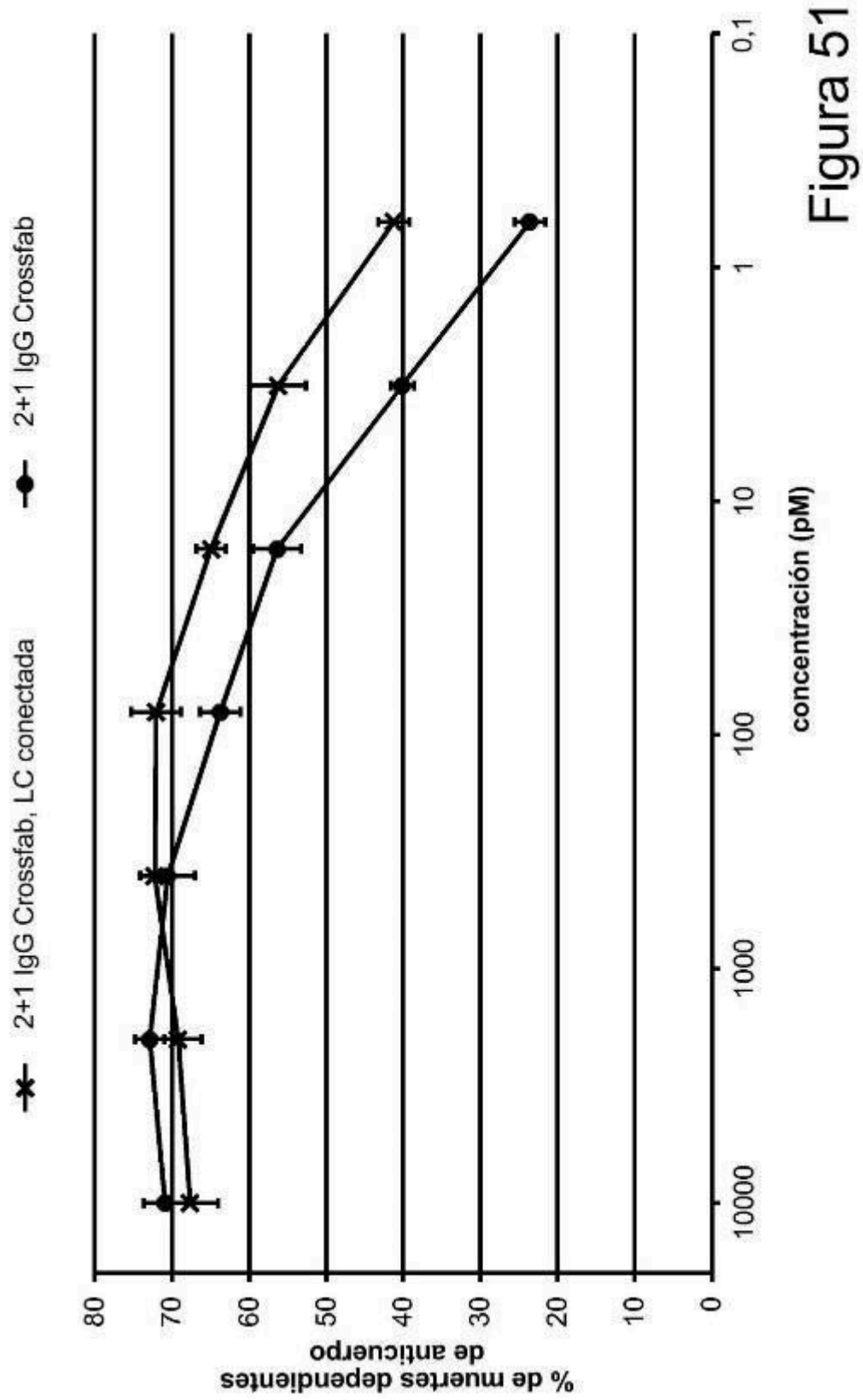

2+1 IgG Crossfab, LC conectada
2+1 IgG Crossfab
% de muertes dependientes de anticuerpo
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10000
1000
100
10
1
0,1
concentración (pM)

Figura 51

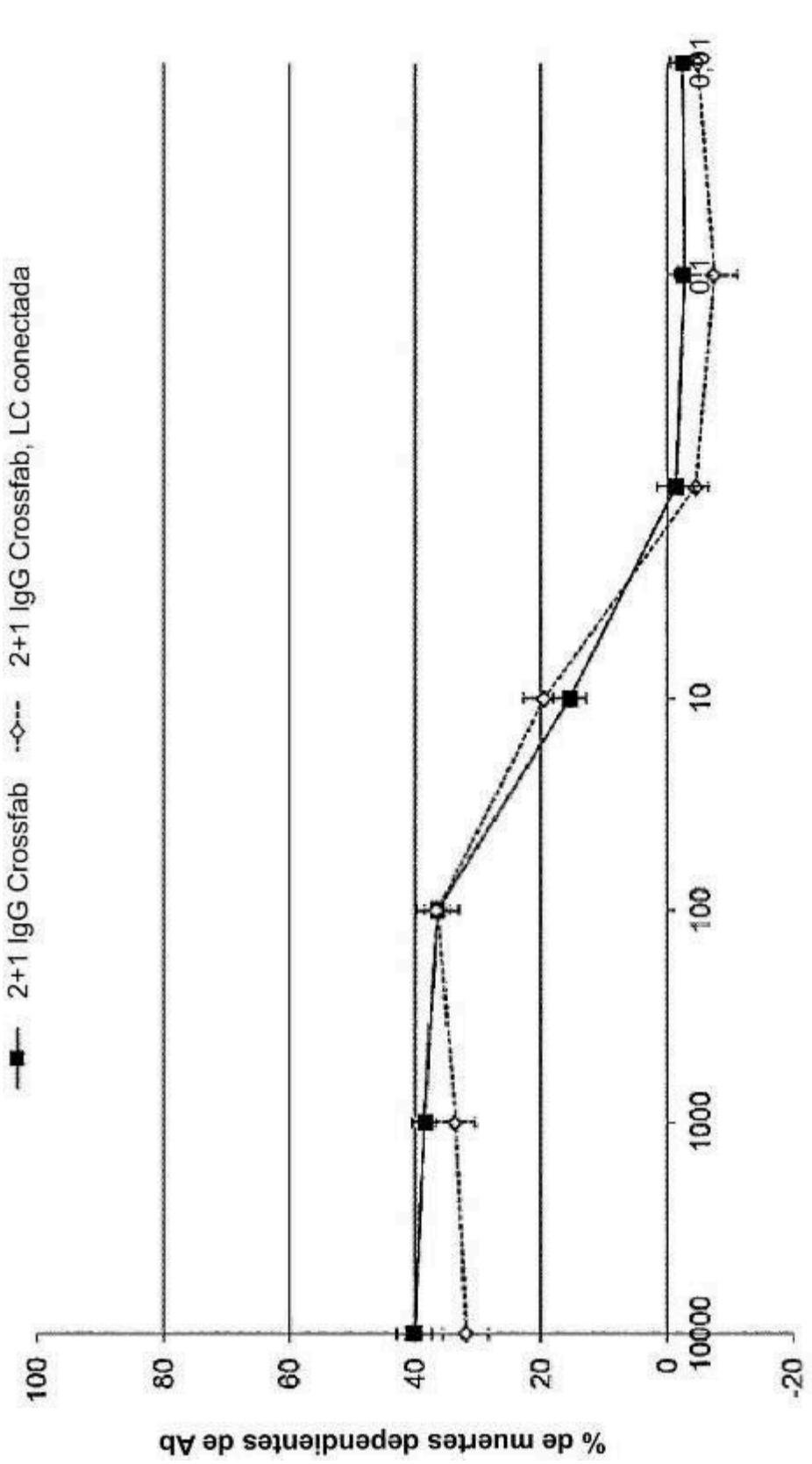

2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, LC conectada
% de muertes dependientes de Ab
100
80
60
40
20
0
-20
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
concentración final de anticuerpo (pM)

Figura 52

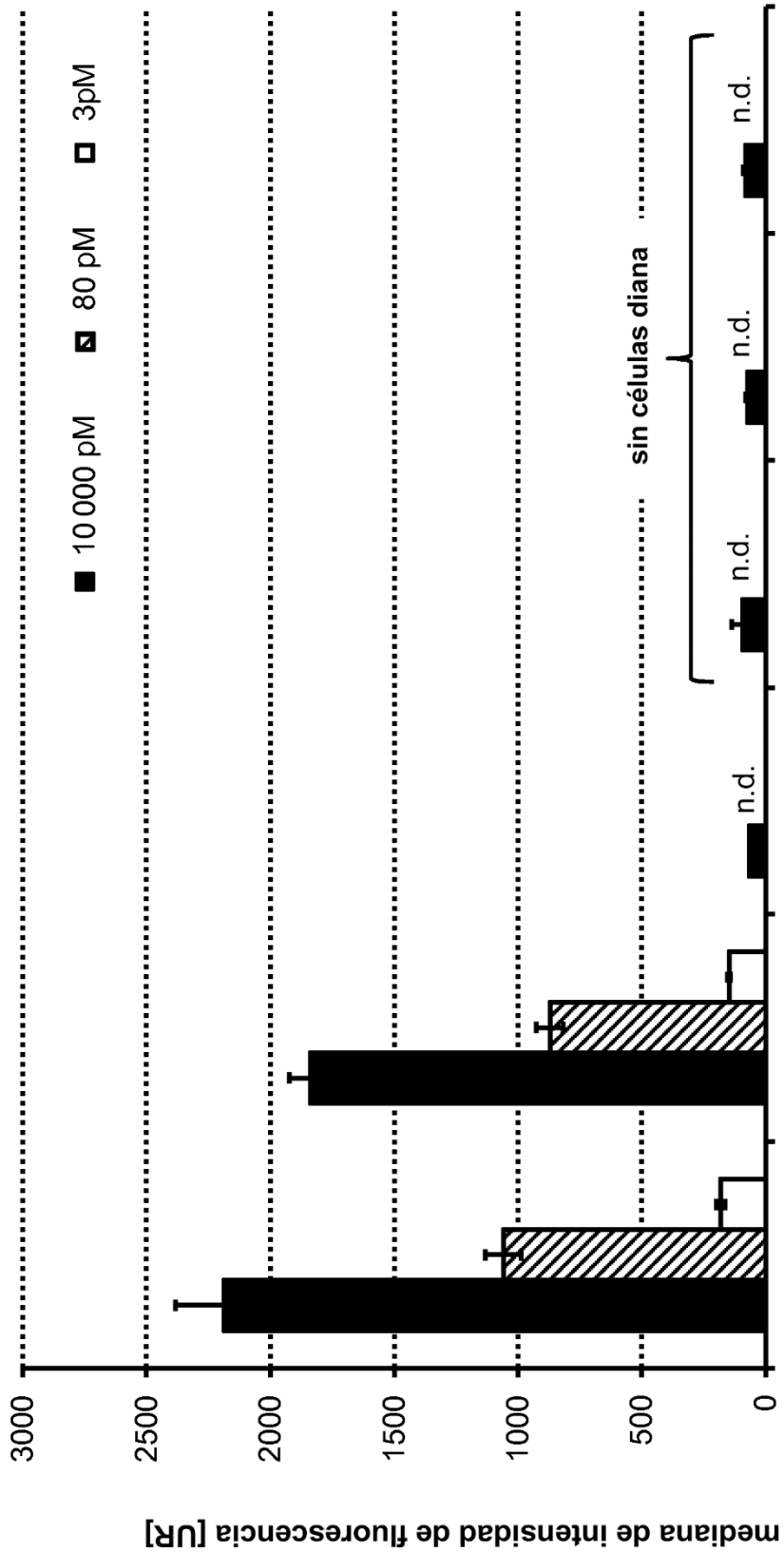

mediana de intensidad de fluorescencia [UR]
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10 000 pM
80 pM
3pM
sin células diana
n.d.
n.d.
n.d.
n.d.
2+1 IgG Crossfab, LC conectada
2+1 IgG Crossfab
PBMC + dianas
2+1 IgG Crossfab, LC conectada
2+1 IgG Crossfab
PBMC

Figura 53A

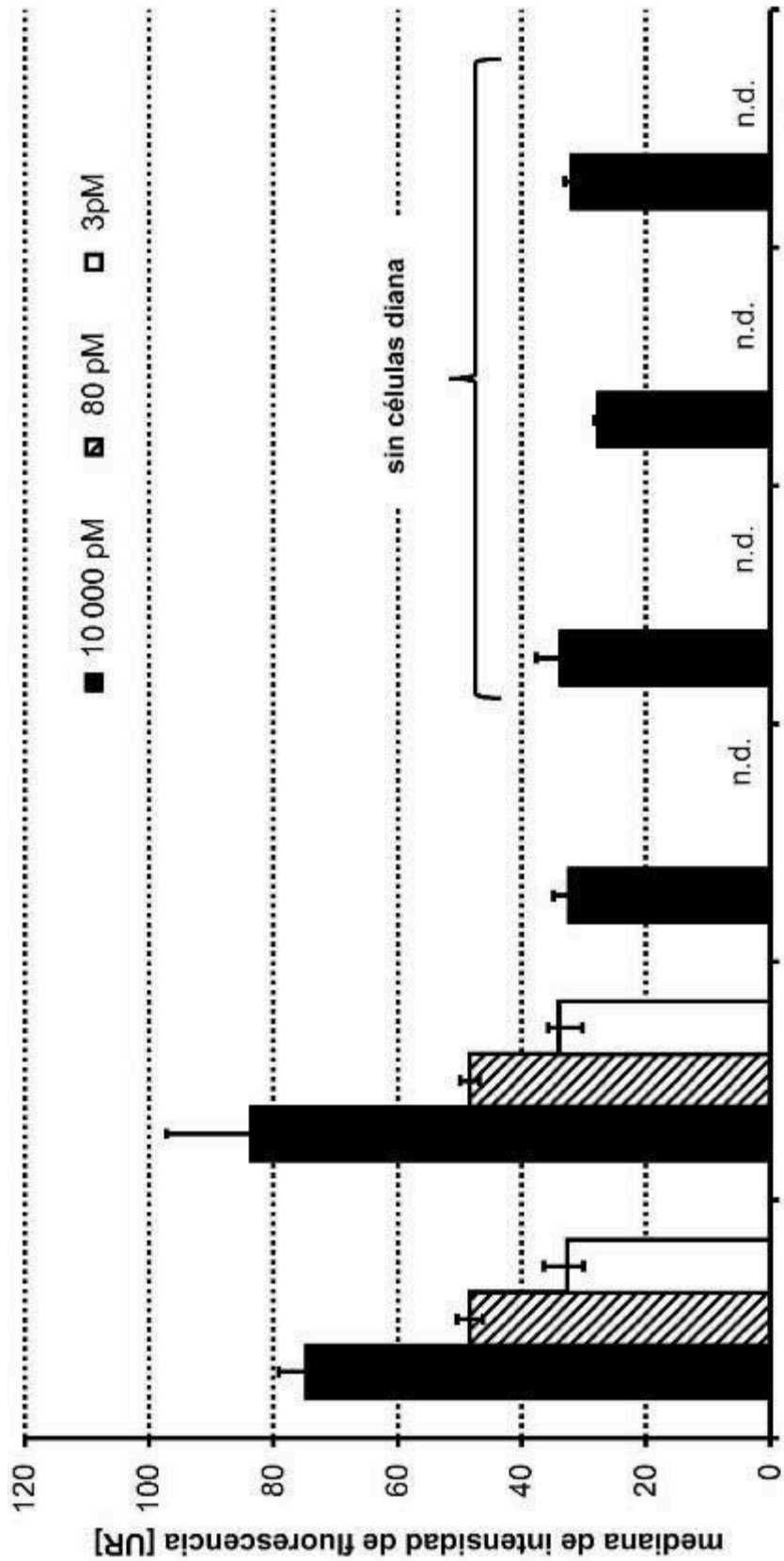

mediana de intensidad de fluorescencia [UR]
120
100
80
60
40
20
0
10 000 pM
80 pM
3pM
sin células diana
n.d.
n.d.
n.d.
n.d.
2+1 IgG Crossfab, LC conectada
2+1 IgG Crossfab
PBMC + dianas
2+1 IgG Crossfab, LC conectada
2+1 IgG Crossfab
PBMC

Figura 53B

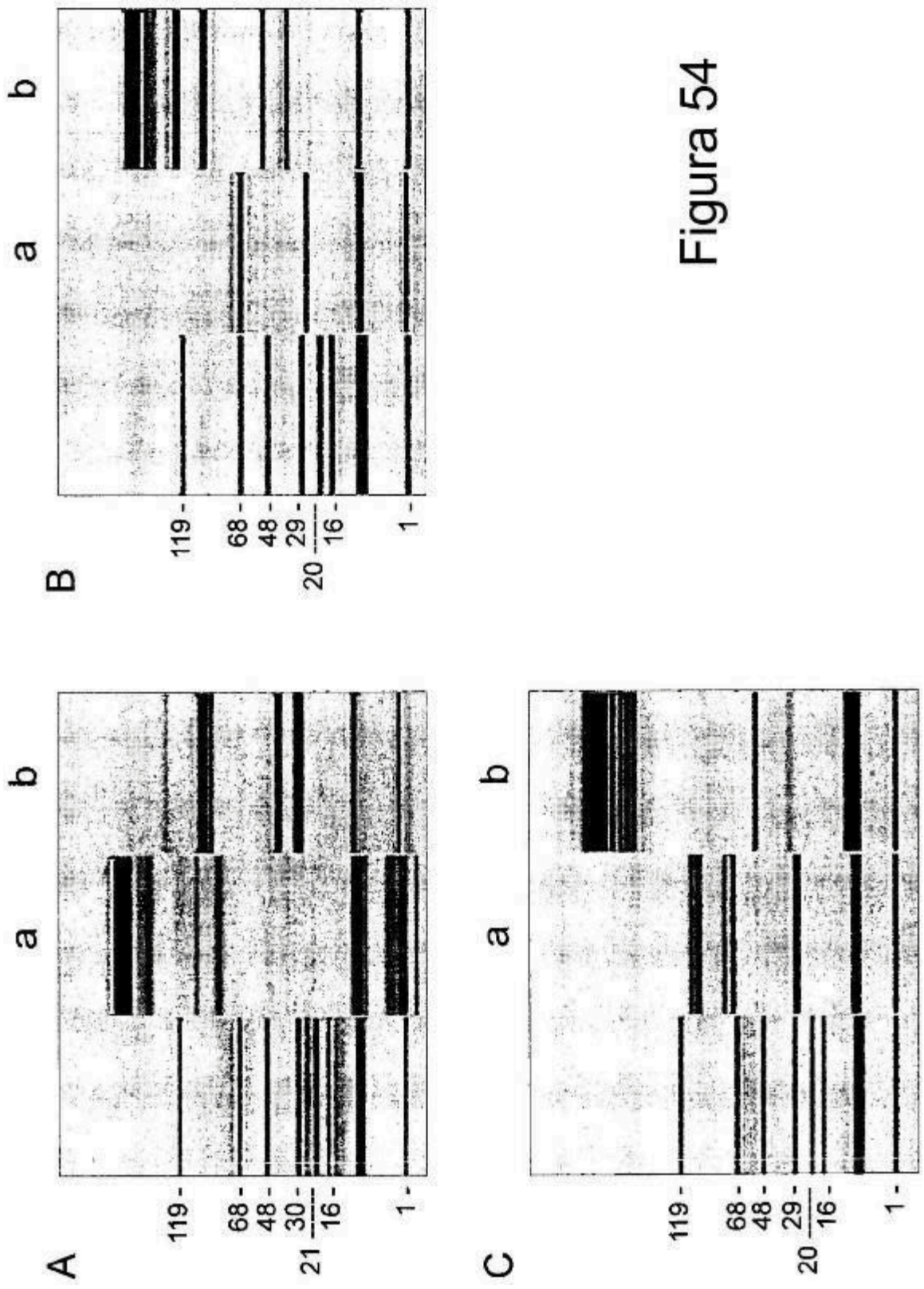

A
a
b
119
68
48
30
21
16
1
B
a
b
119
68
48
29
20
16
1
C
a
b
119
68
48
29
20
16
1

Figura 54

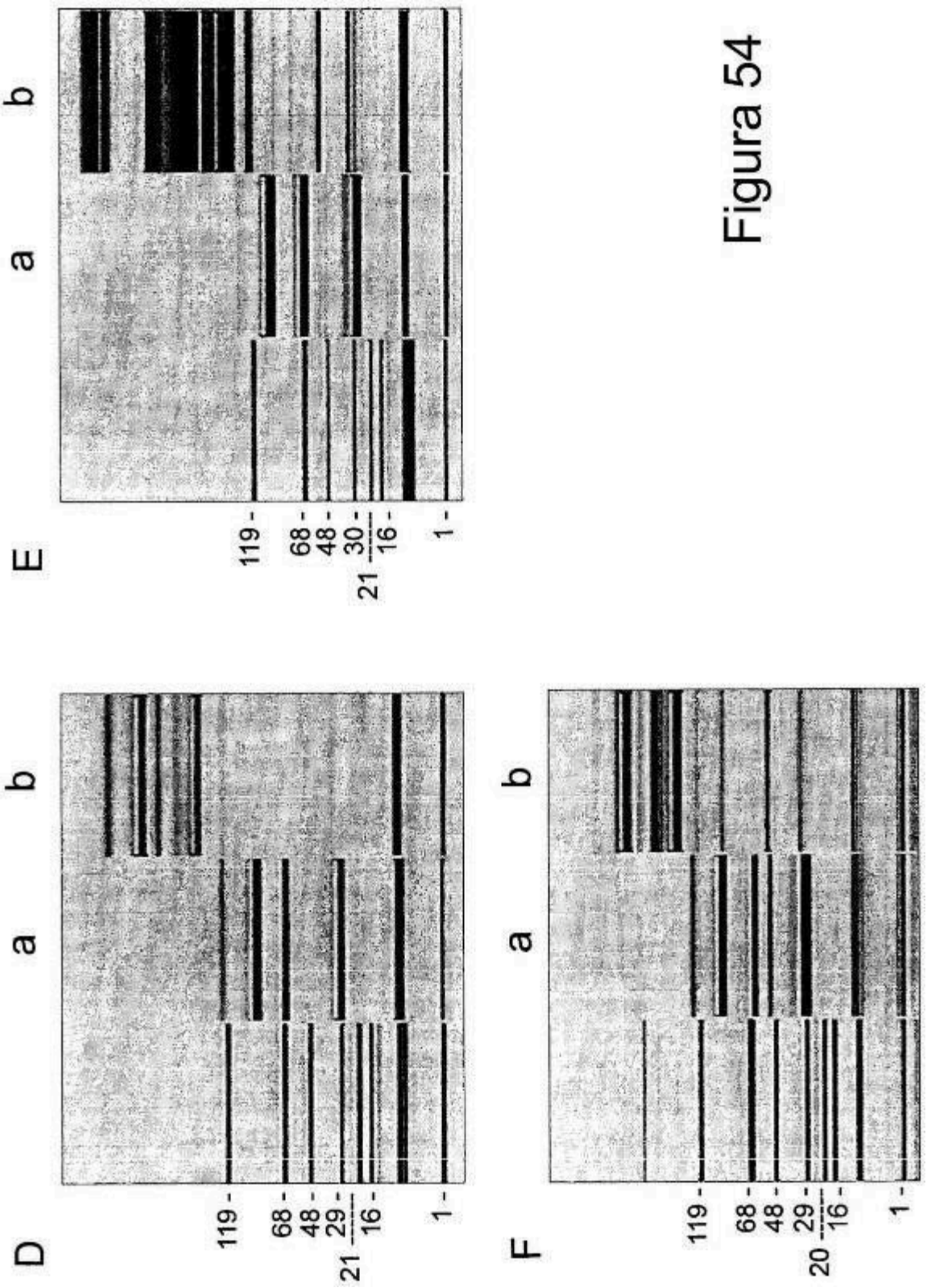

D
a
b
119
68
48
29
21
16
1
E
a
b
119
68
48
30
21
16
1
F
a
b
119
68
48
29
20
16
1

Figura 54

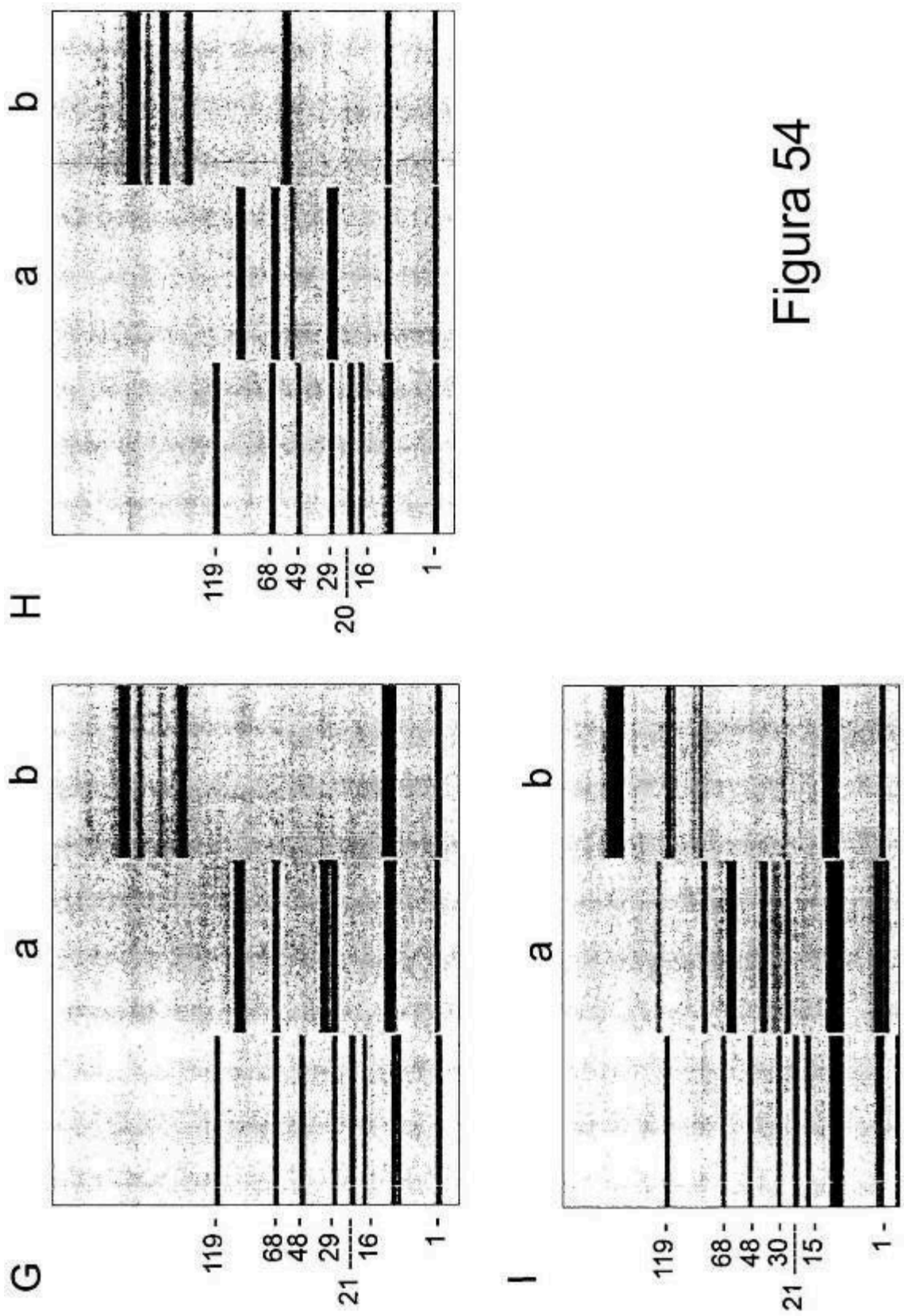

G
a
b
119 -
68 -
48 -
29 -
21 -
16 -
1 -
H
a
b
119 -
68 -
49 -
29 -
20 -
16 -
1 -
I
a
b
119 -
68 -
48 -
30 -
21 -
15 -
1 -

Figura 54

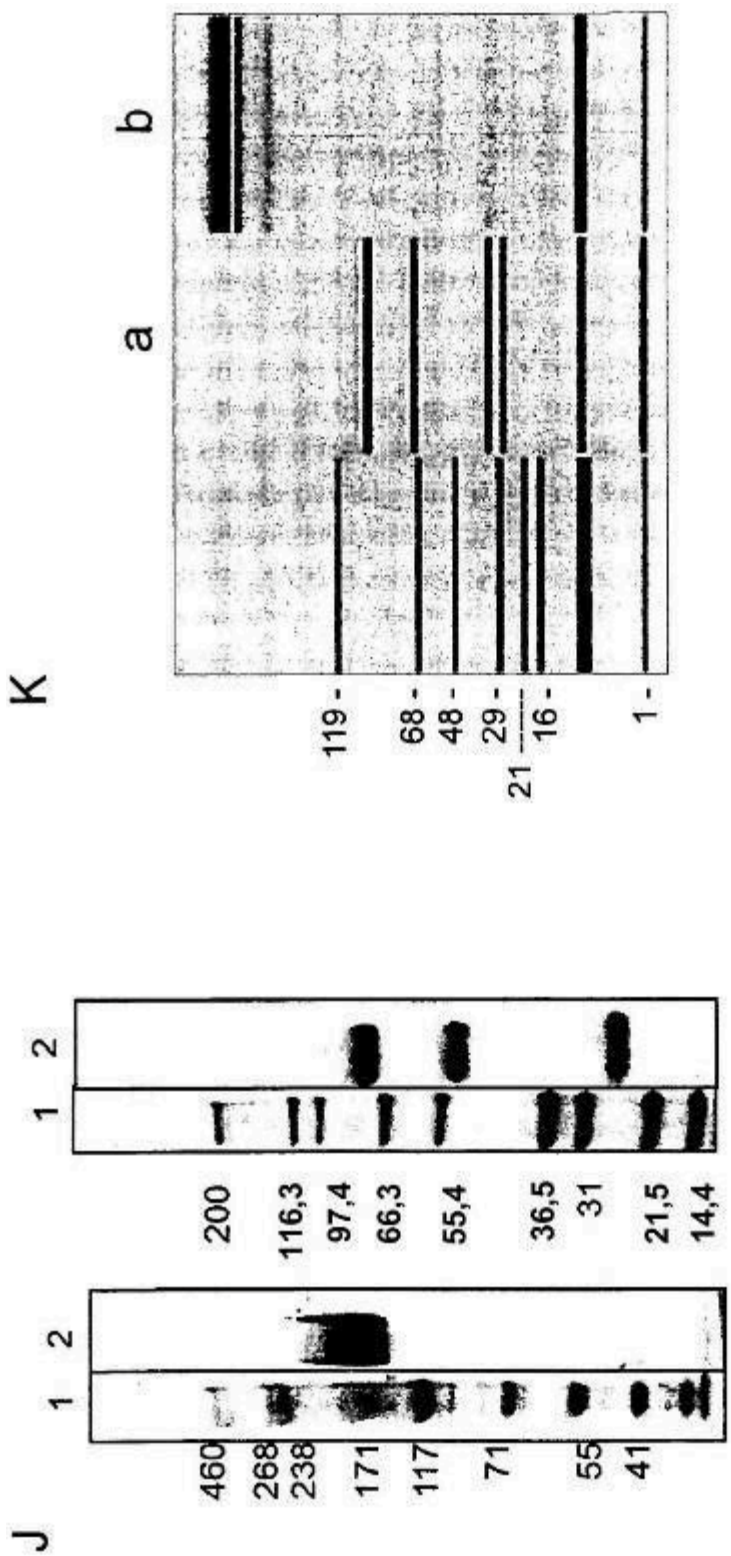

J
1
2
460
268
238
171
117
71
55
41
200
116,3
97,4
66,3
55,4
36,5
31
21,5
14,4
K
a
b
119
68
48
29
21
16
1

Figura 54

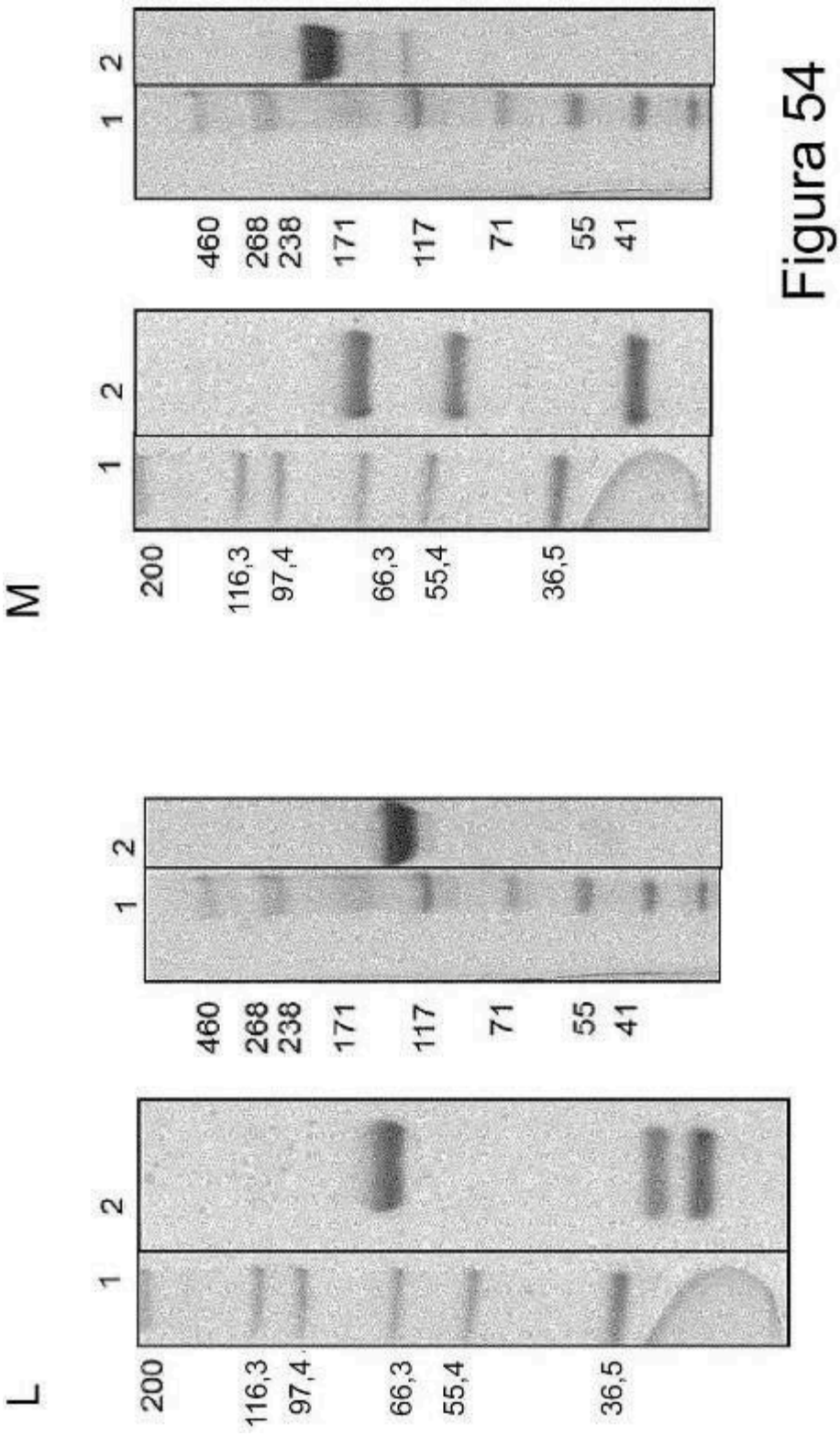
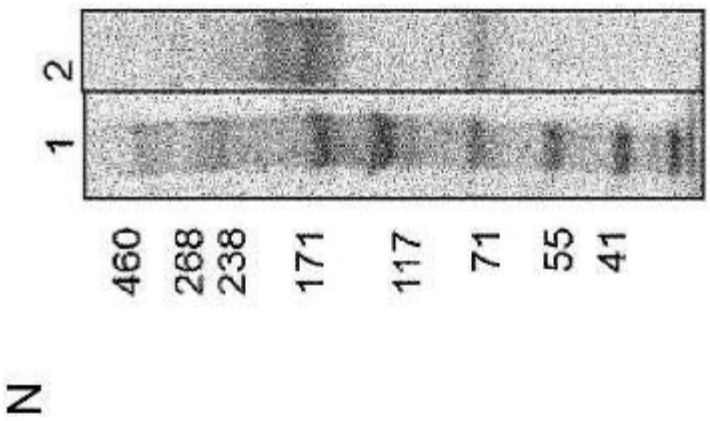


Figura 54

Figura 54



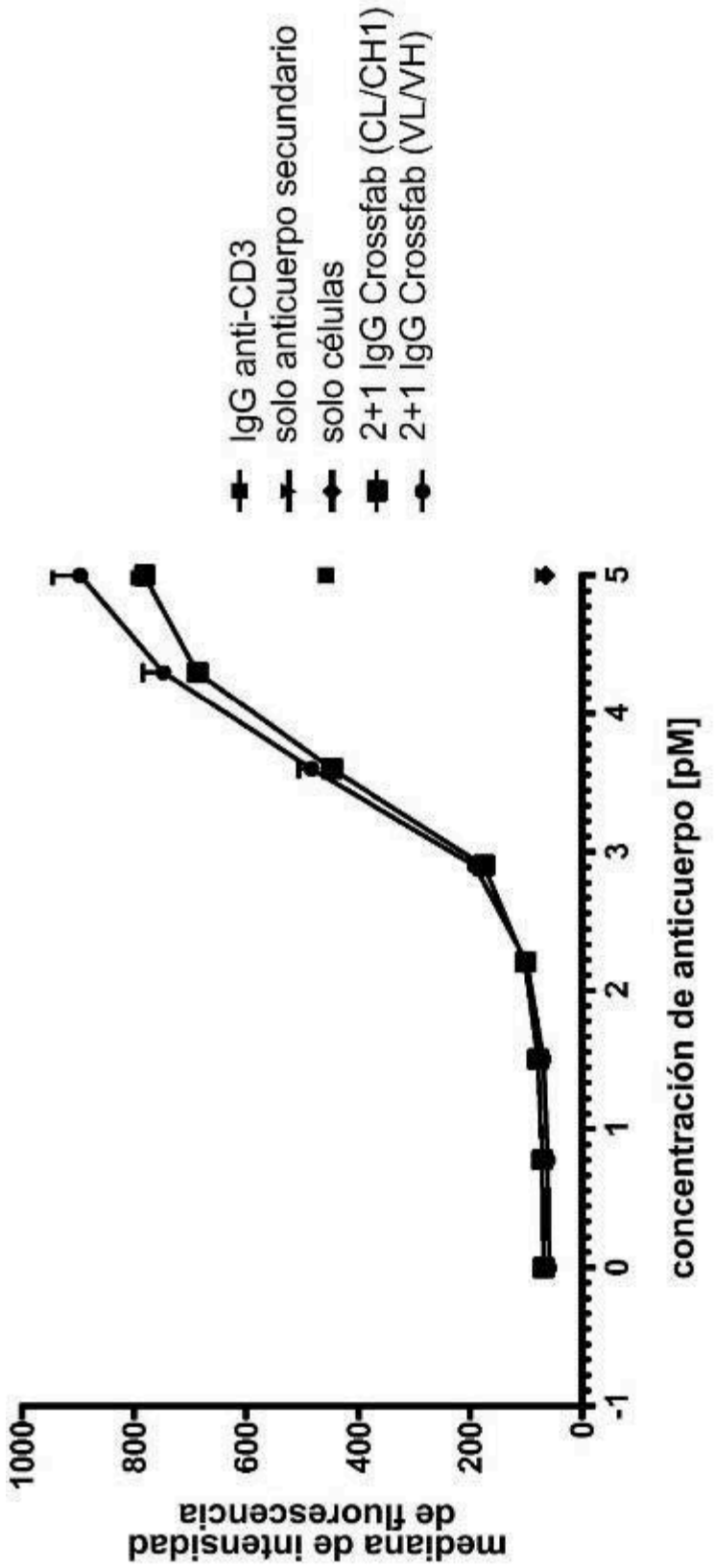

IgG anti-CD3
solo anticuerpo secundario
solo células
2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)
2+1 IgG Crossfab (VL/VH)
mediana de intensidad de fluorescencia
1000
800
600
400
200
0
-1
0
1
2
3
4
5
concentración de anticuerpo [pM]

Figura 55A

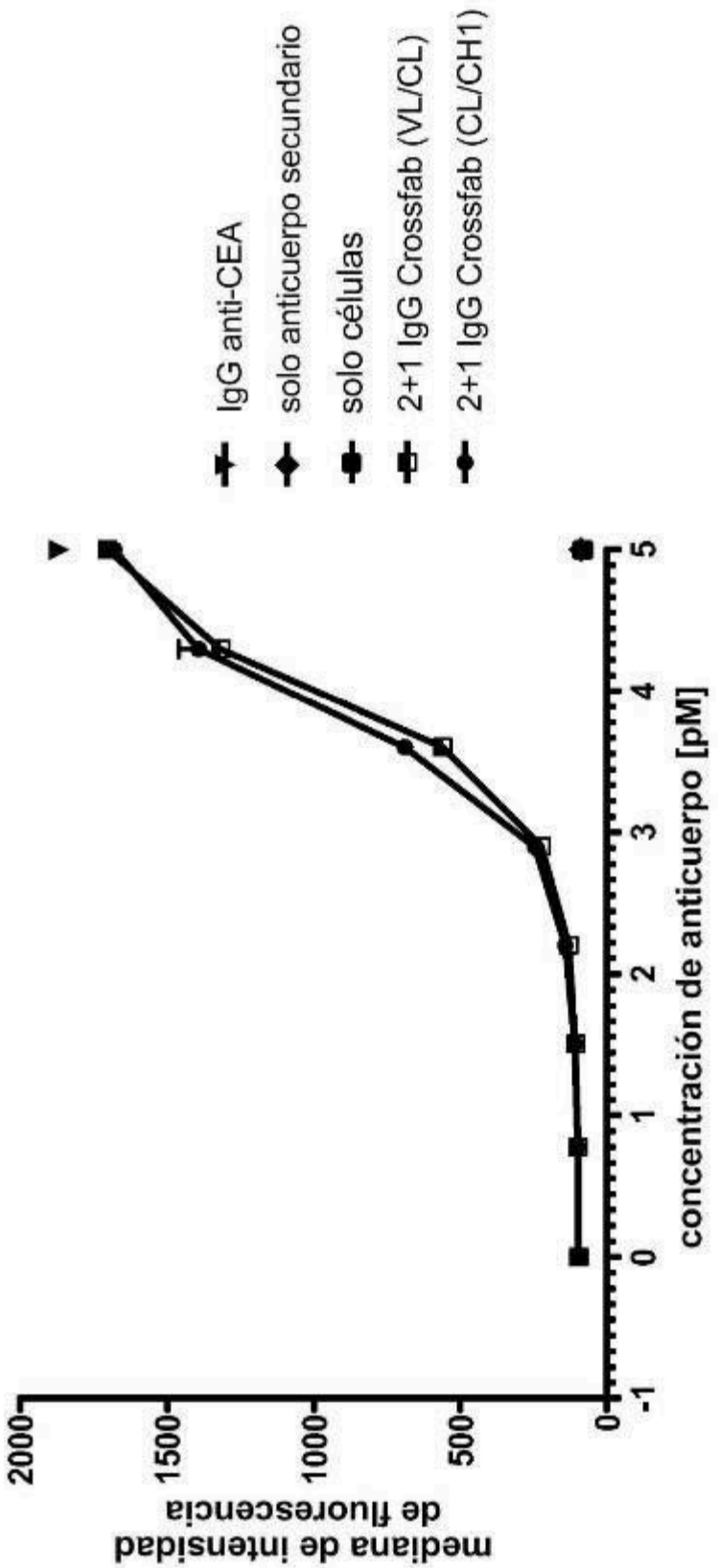

IgG anti-CEA
solo anticuerpo secundario
solo células
2+1 IgG Crossfab (VL/CL)
2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)
mediana de intensidad de fluorescencia
2000
1500
1000
500
0
-1
0
1
2
3
4
5
concentración de anticuerpo [pM]

Figura 55B

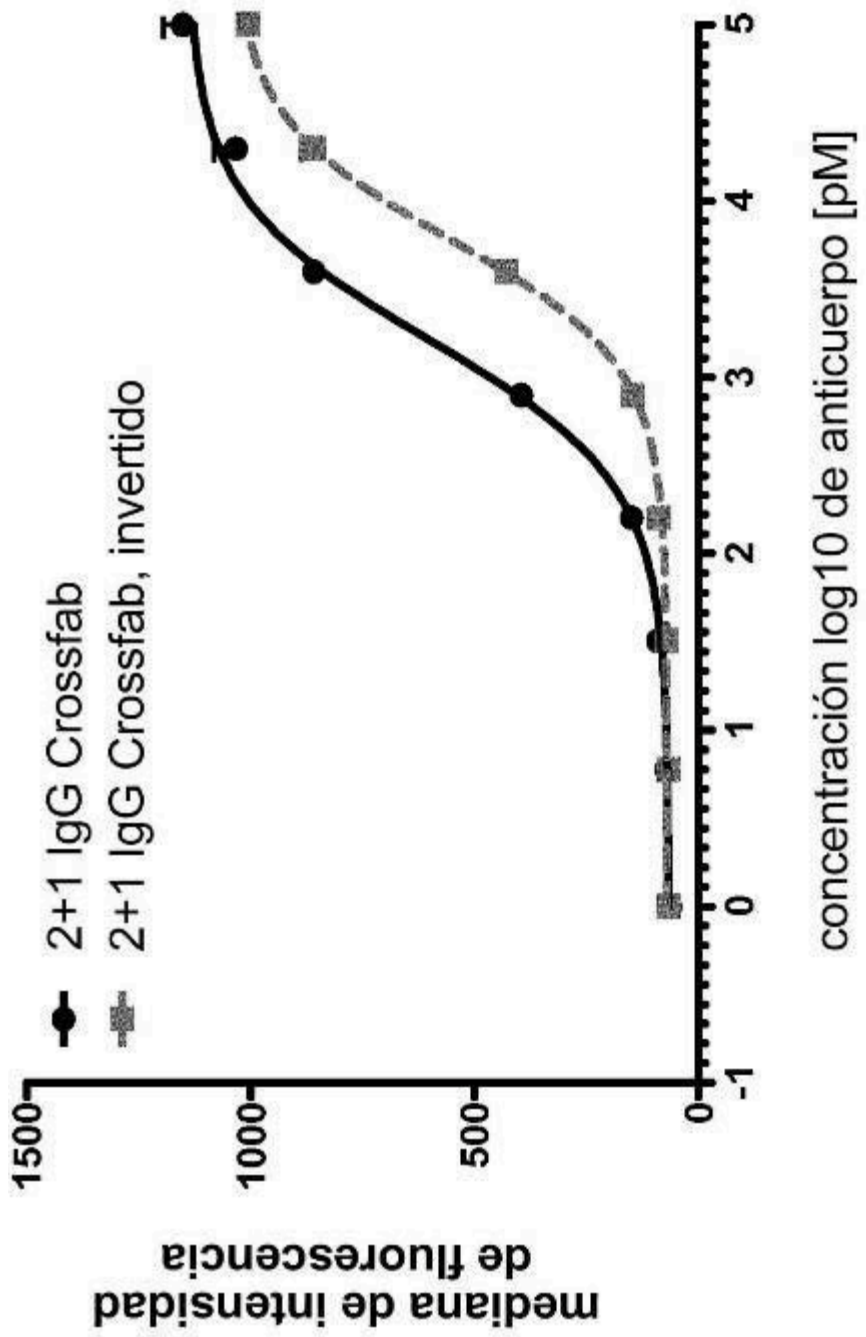

2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido
mediana de intensidad de fluorescencia
1500
1000
500
0
-1
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de anticuerpo [pM]

Figura 56A

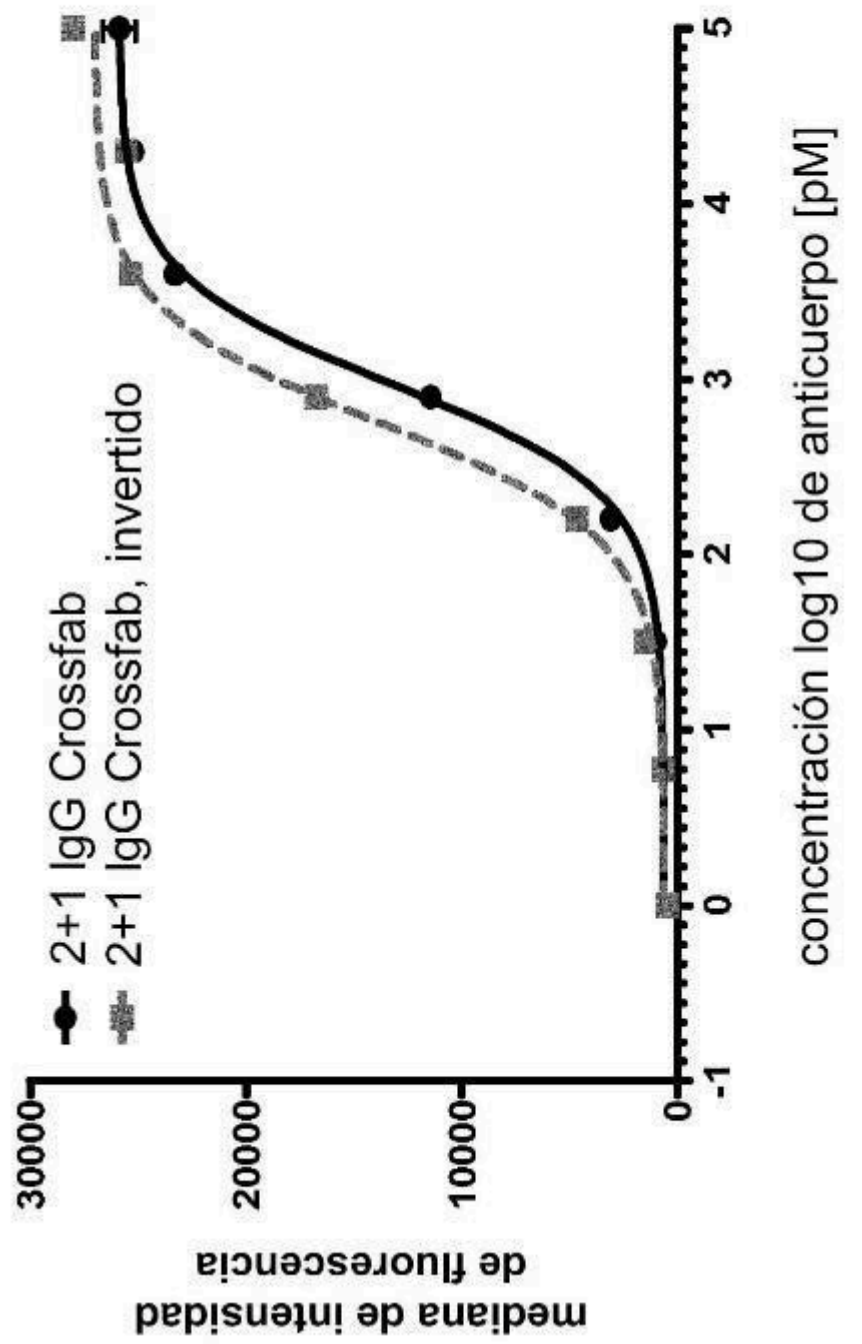

mediana de intensidad de fluorescencia
30000
20000
10000
0
-1
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de anticuerpo [pM]
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido

Figura 56B

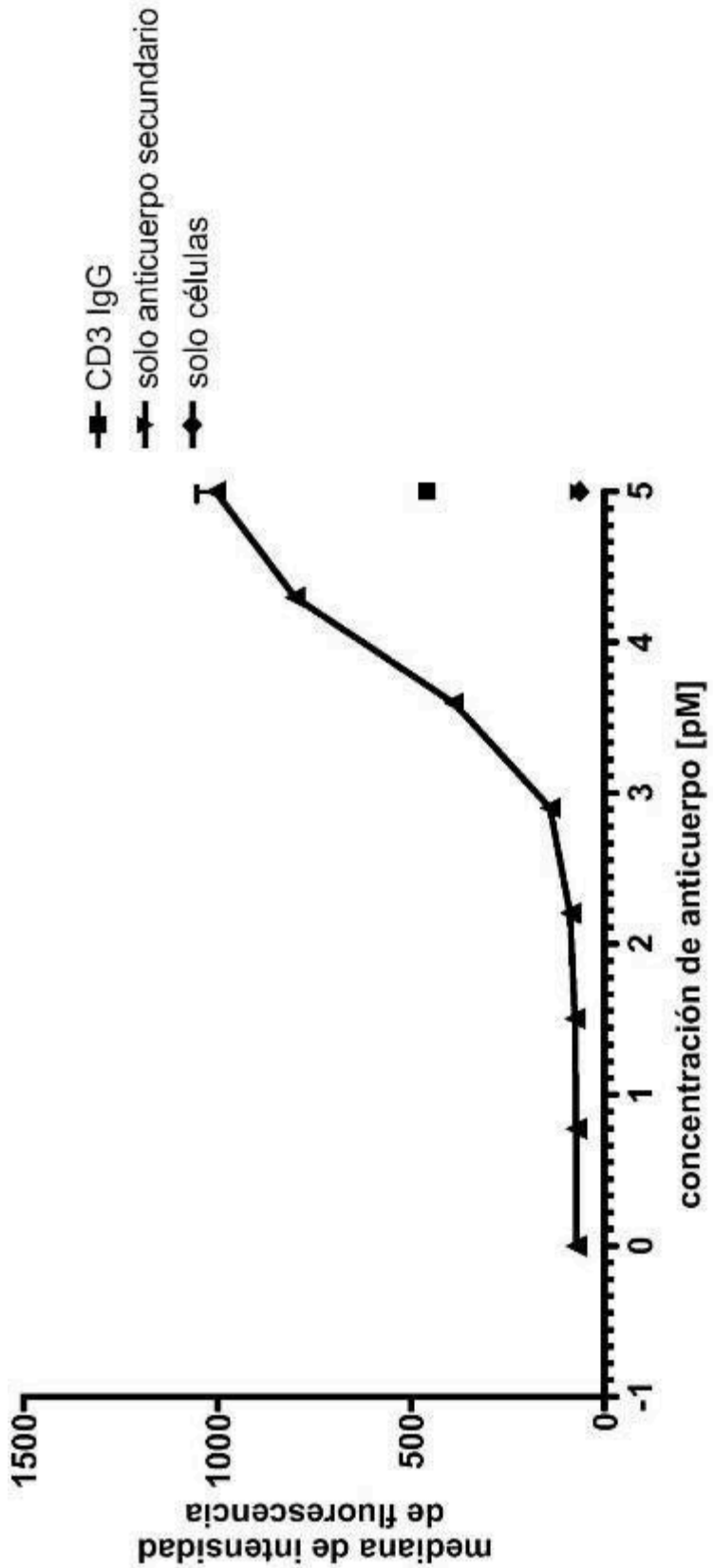

CD3 IgG
solo anticuerpo secundario
solo células
mediana de intensidad de fluorescencia
1500
1000
500
0
-1
0
1
2
3
4
5
concentración de anticuerpo [pM]

Figura 57A

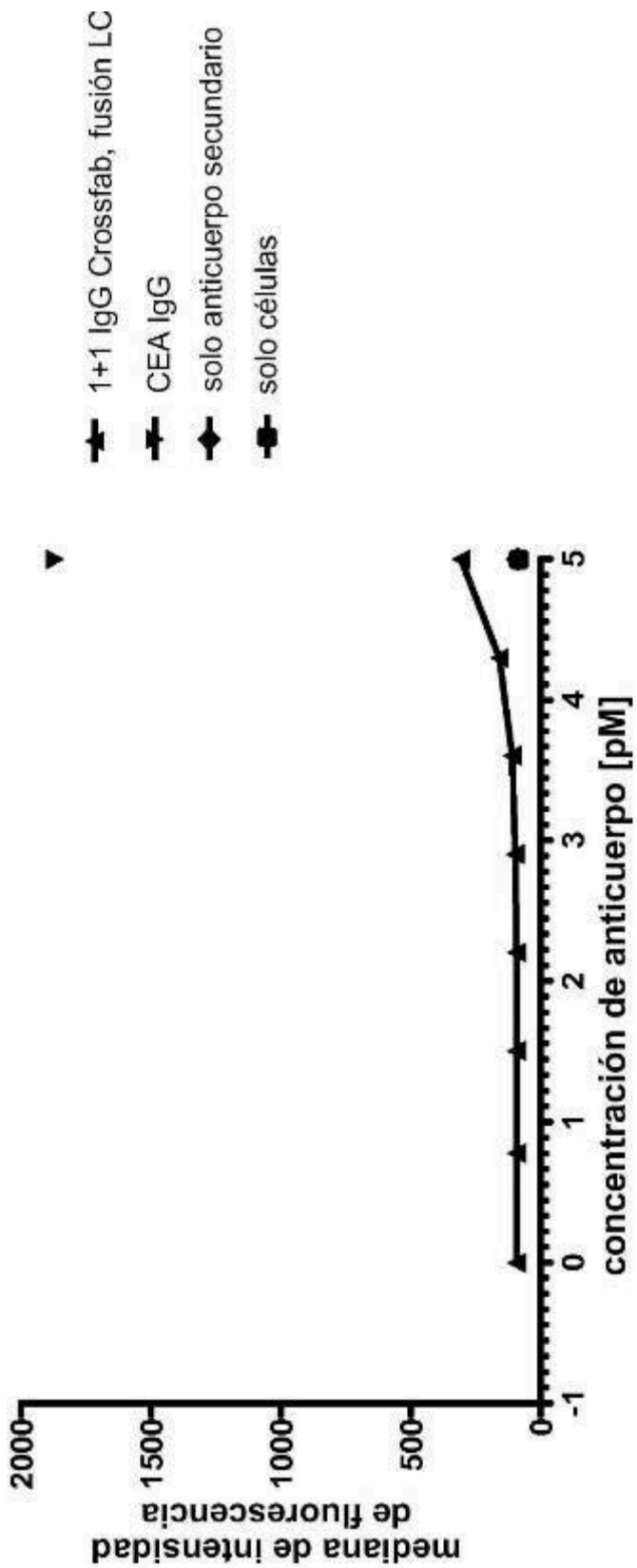

1+1 IgG Crossfab, fusión LC
CEA IgG
solo anticuerpo secundario
solo células
mediana de intensidad de fluorescencia
2000
1500
1000
500
0
-1
0
1
2
3
4
5
concentración de anticuerpo [pM]

Figura 57B

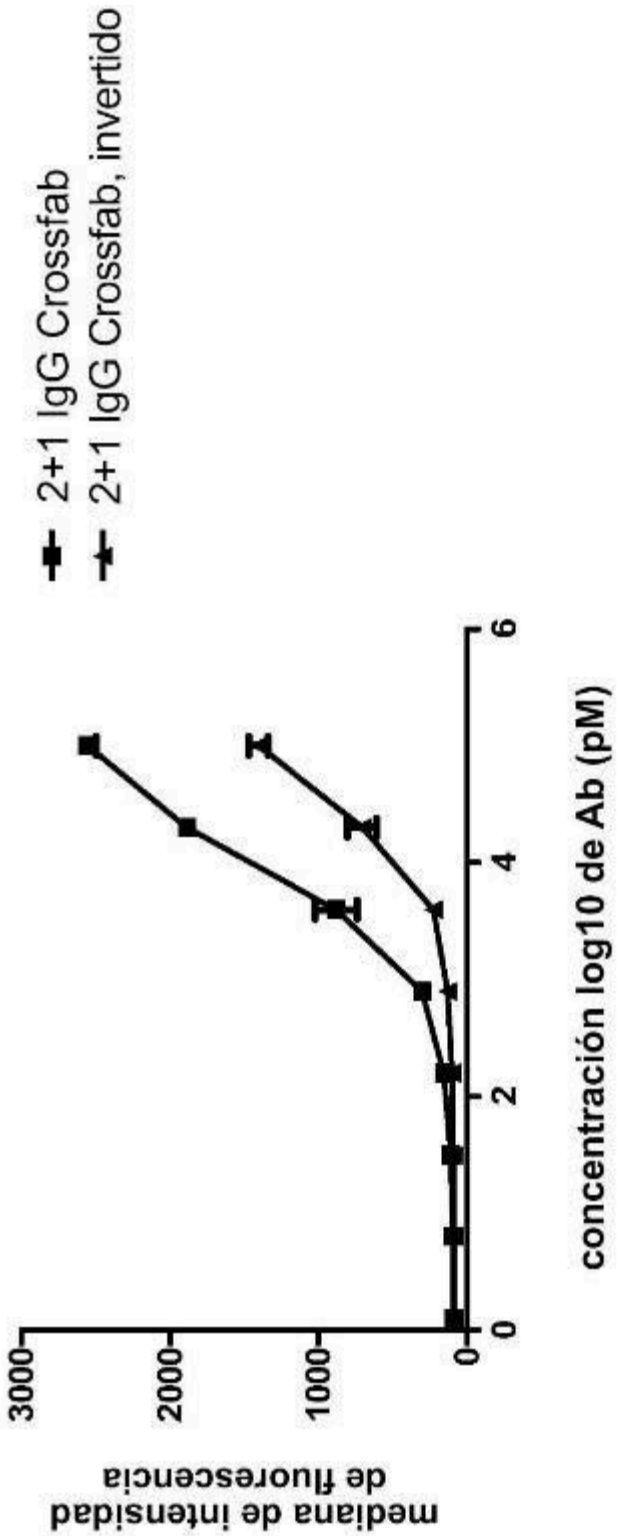

2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido
mediana de intensidad de fluorescencia
3000
2000
1000
0
0
2
4
6
concentración log10 de Ab (pM)

Figura 58A

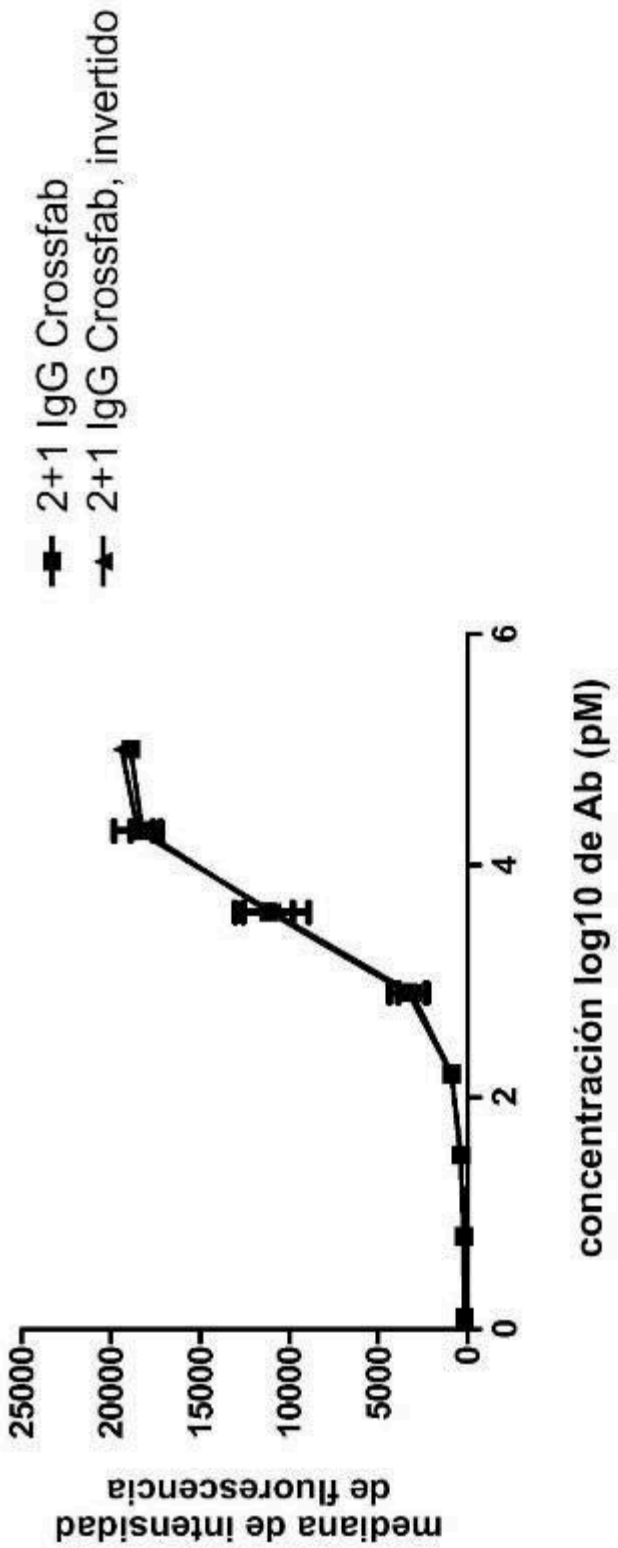

2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido
mediana de intensidad de fluorescencia
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
concentración log10 de Ab (pM)

Figura 58B

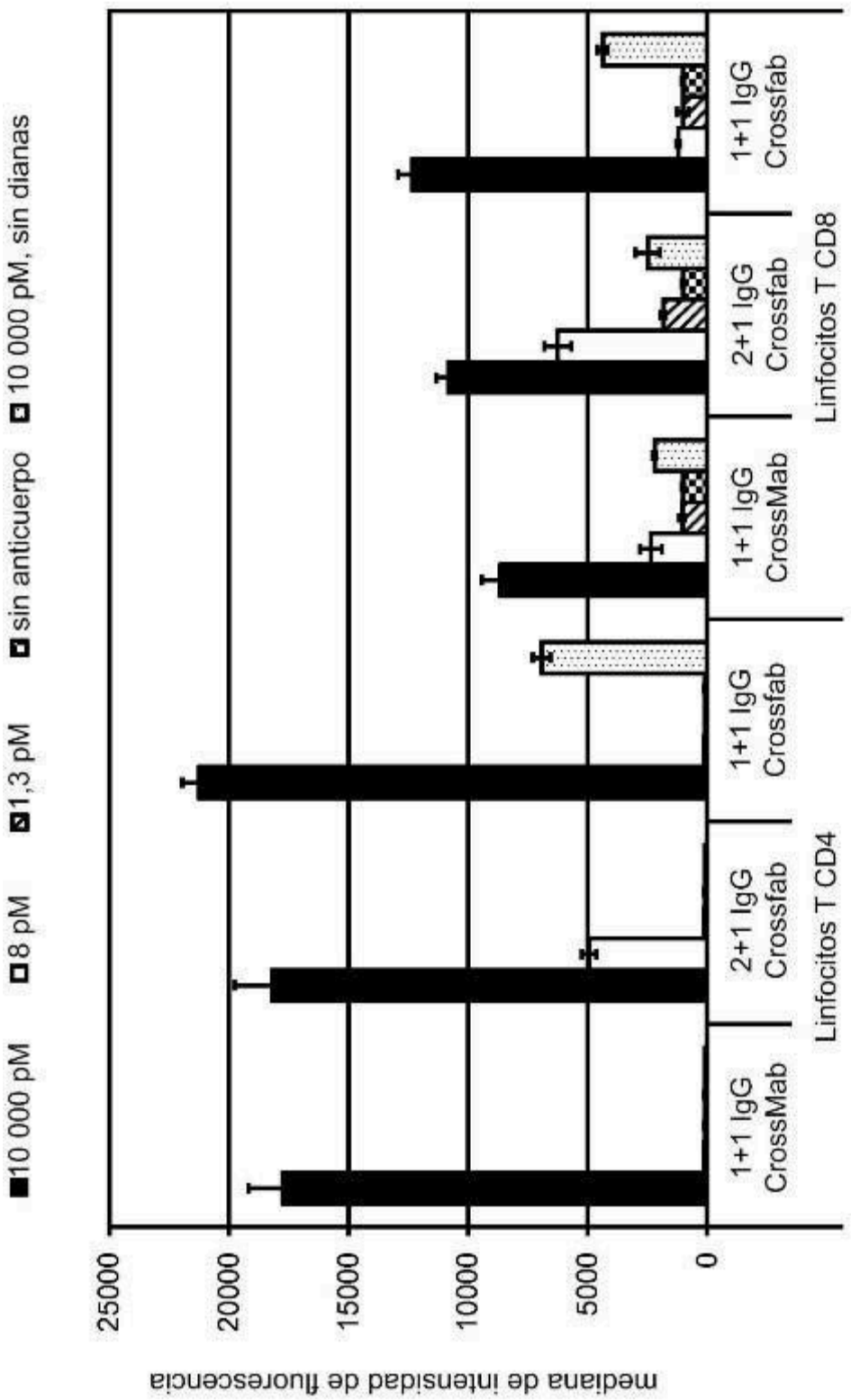

10 000 pM
8 pM
1,3 pM
sin anticuerpo
10 000 pM, sin dianas
mediana de intensidad de fluorescencia
25000
20000
15000
10000
5000
0
1+1 IgG CrossMab
2+1 IgG Crossfab
1+1 IgG Crossfab
1+1 IgG CrossMab
2+1 IgG Crossfab
1+1 IgG Crossfab
Linfocitos T CD4
Linfocitos T CD8

Figura 59A

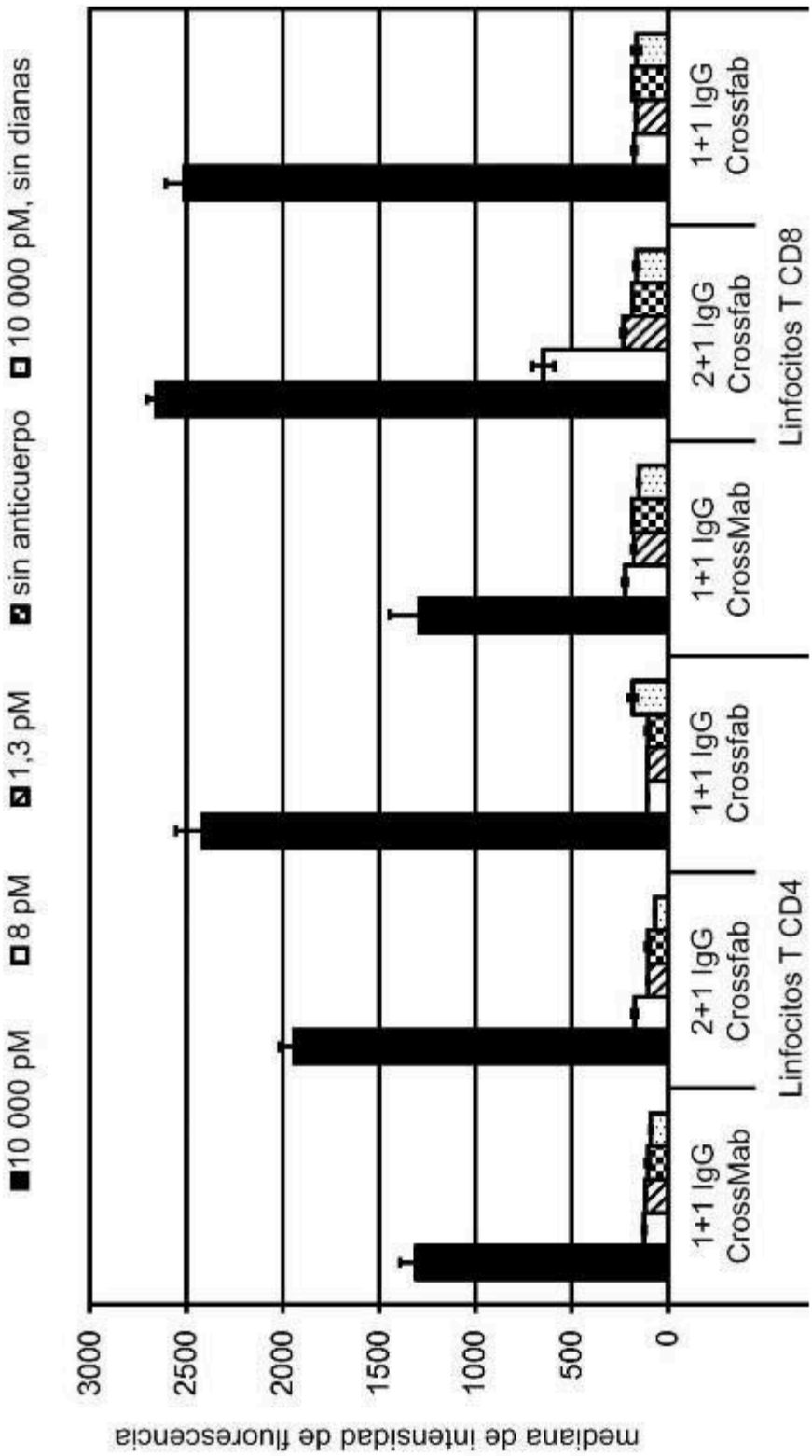

10 000 pM
8 pM
1,3 pM
sin anticuerpo
10 000 pM, sin dianas
mediana de intensidad de fluorescencia
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1+1 IgG CrossMab
2+1 IgG Crossfab
1+1 IgG Crossfab
1+1 IgG CrossMab
2+1 IgG Crossfab
1+1 IgG Crossfab
Linfocitos T CD4
Linfocitos T CD8

Figura 59B

Figura 60A

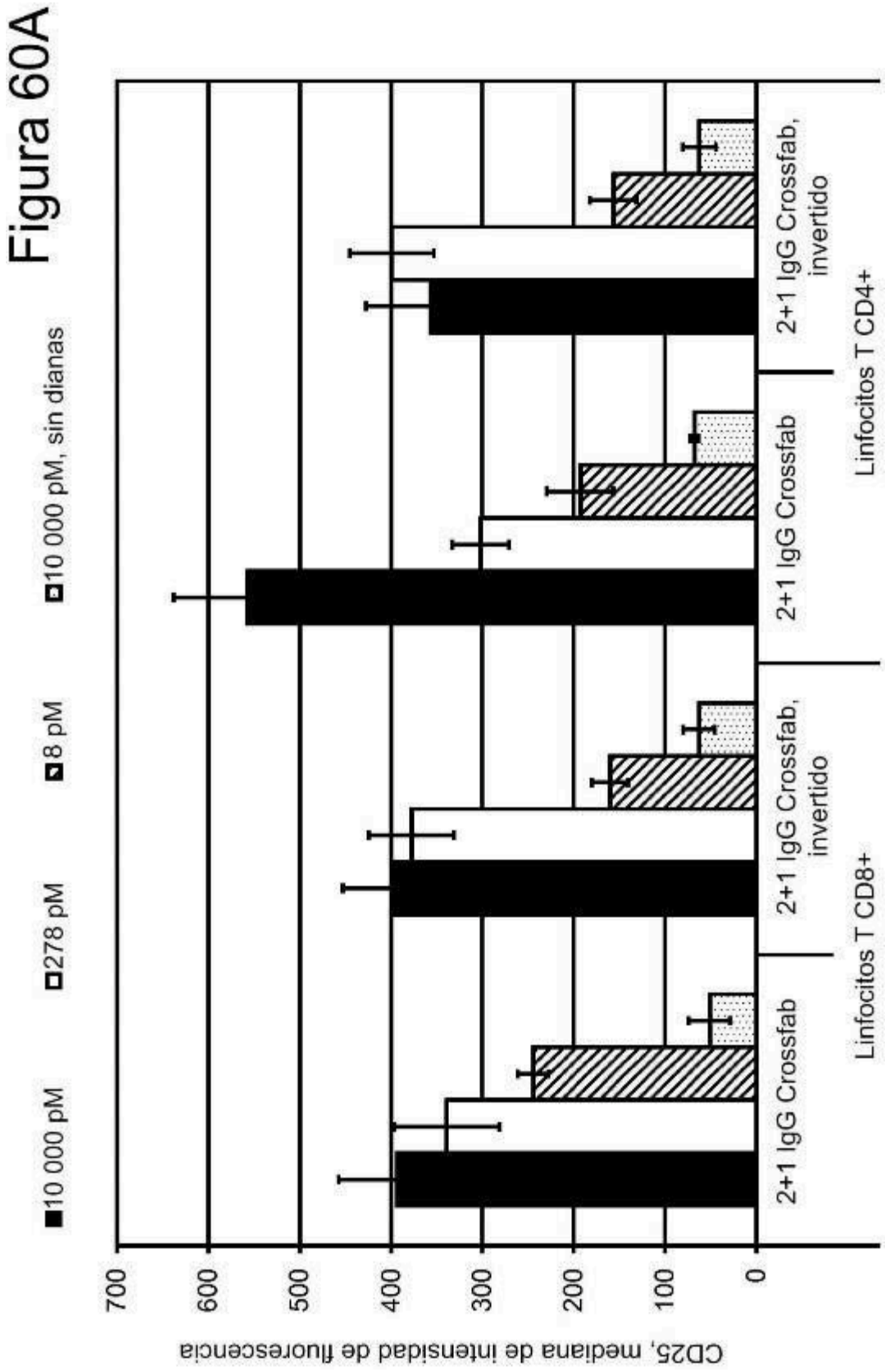
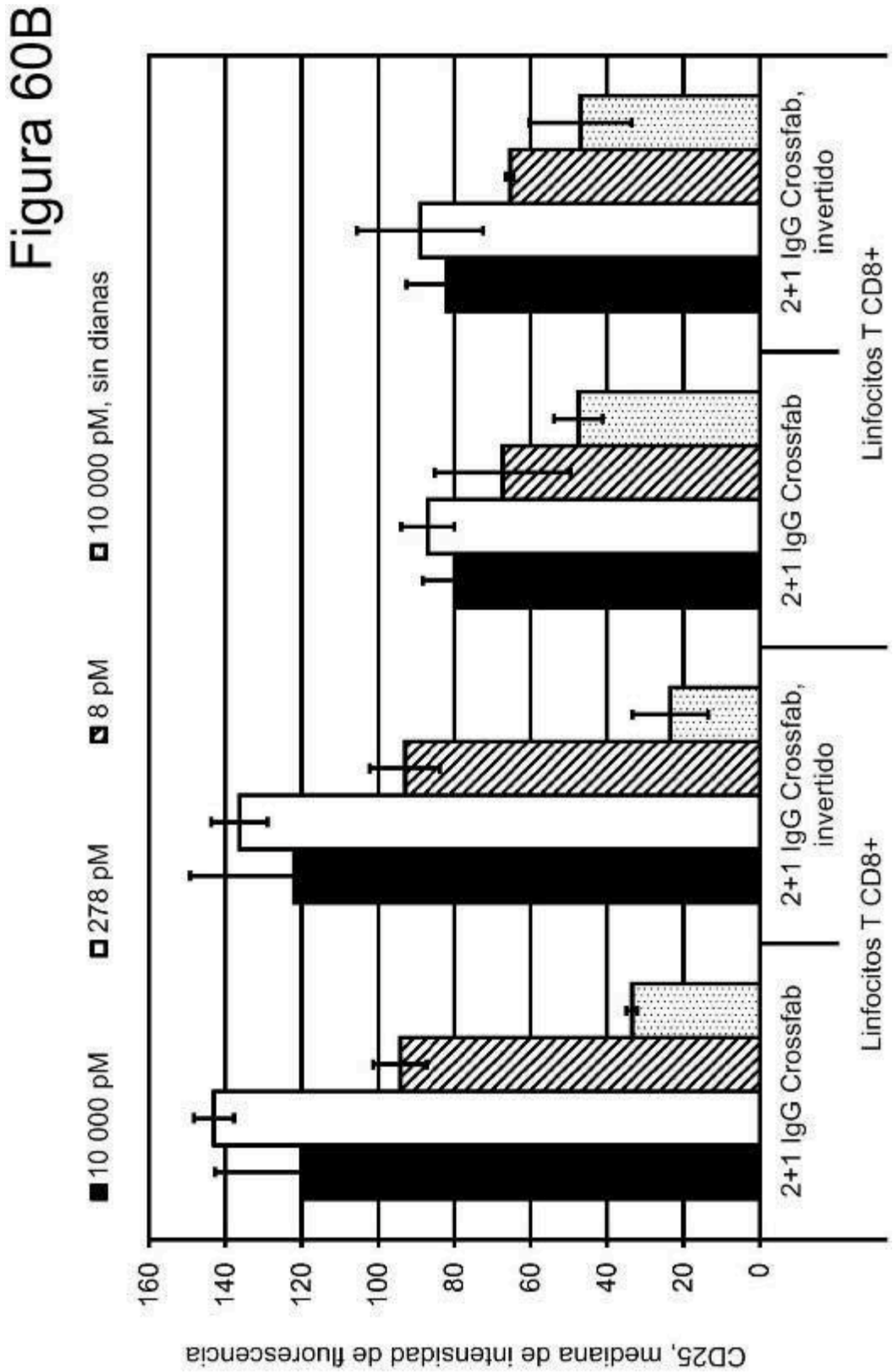

■10 000 pM
□278 pM
◘8 pM
◘10 000 pM, sin dianas
CD25, mediana de intensidad de fluorescencia
700
600
500
400
300
200
100
0
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido
Linfocitos T CD8+
Linfocitos T CD4+

Figura 60B


10 000 pM
278 pM
8 pM
10 000 pM, sin dianas
CD25, mediana de intensidad de fluorescencia
160
140
120
100
80
60
40
20
0
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido
2+1 IgG Crossfab
2+1 IgG Crossfab, invertido
Linfocitos T CD8+
Linfocitos T CD8+

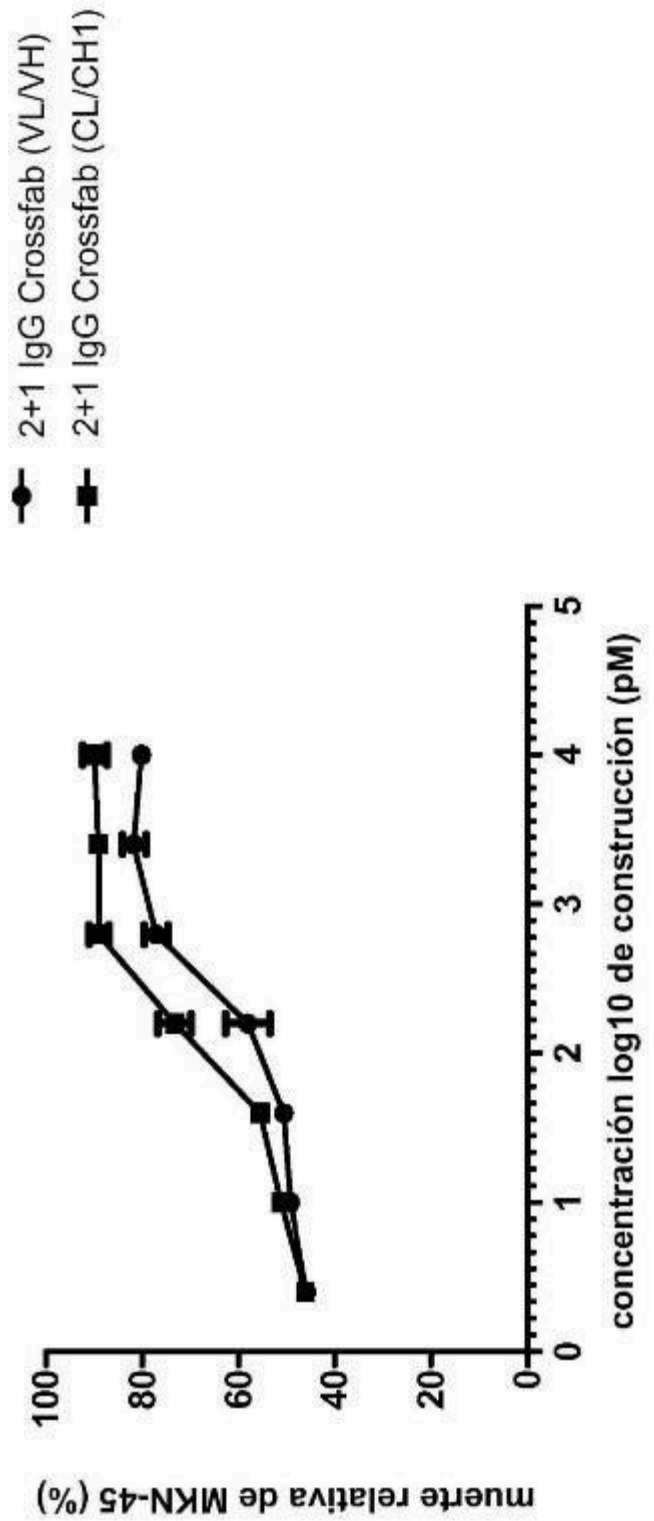

2+1 IgG Crossfab (VL/VH)
2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)
muerte relativa de MKN-45 (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 61A

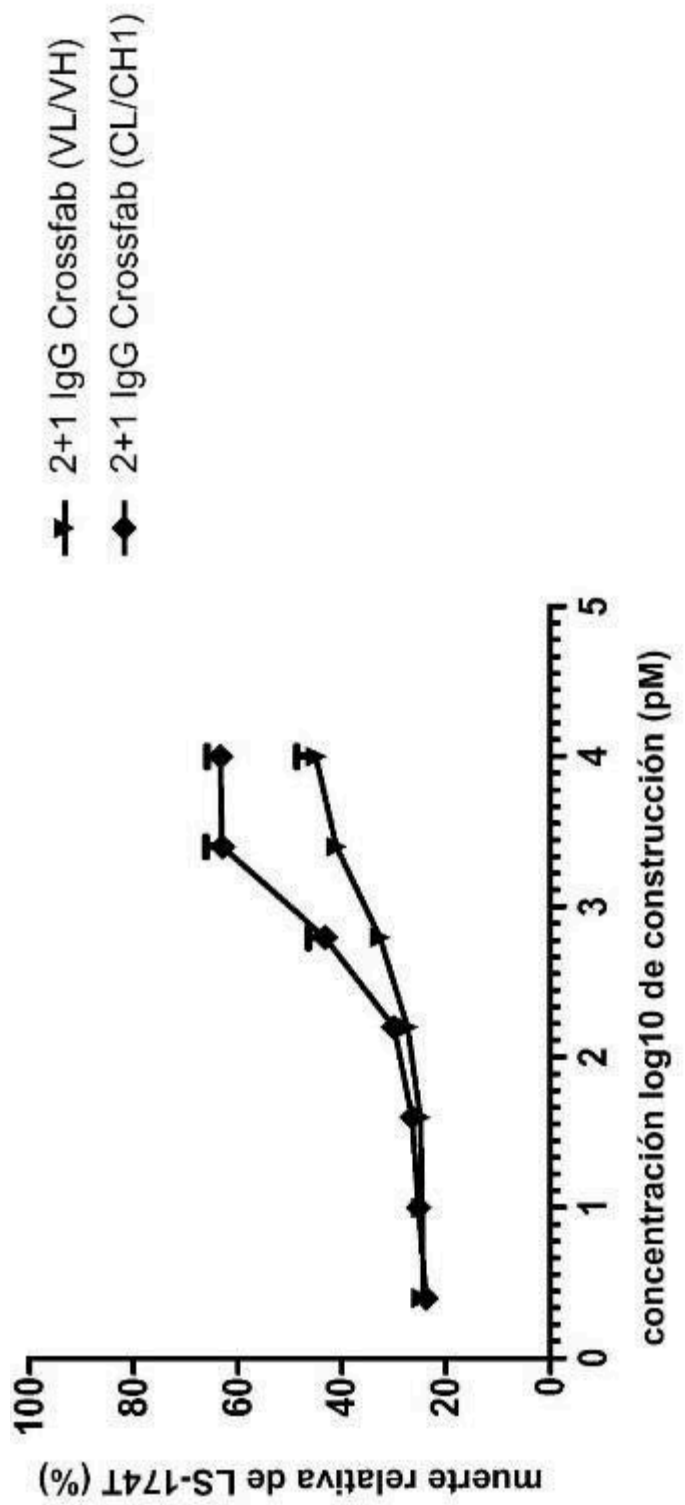

2+1 IgG Crossfab (VL/VH)
2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)
muerte relativa de LS-174T (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 61B

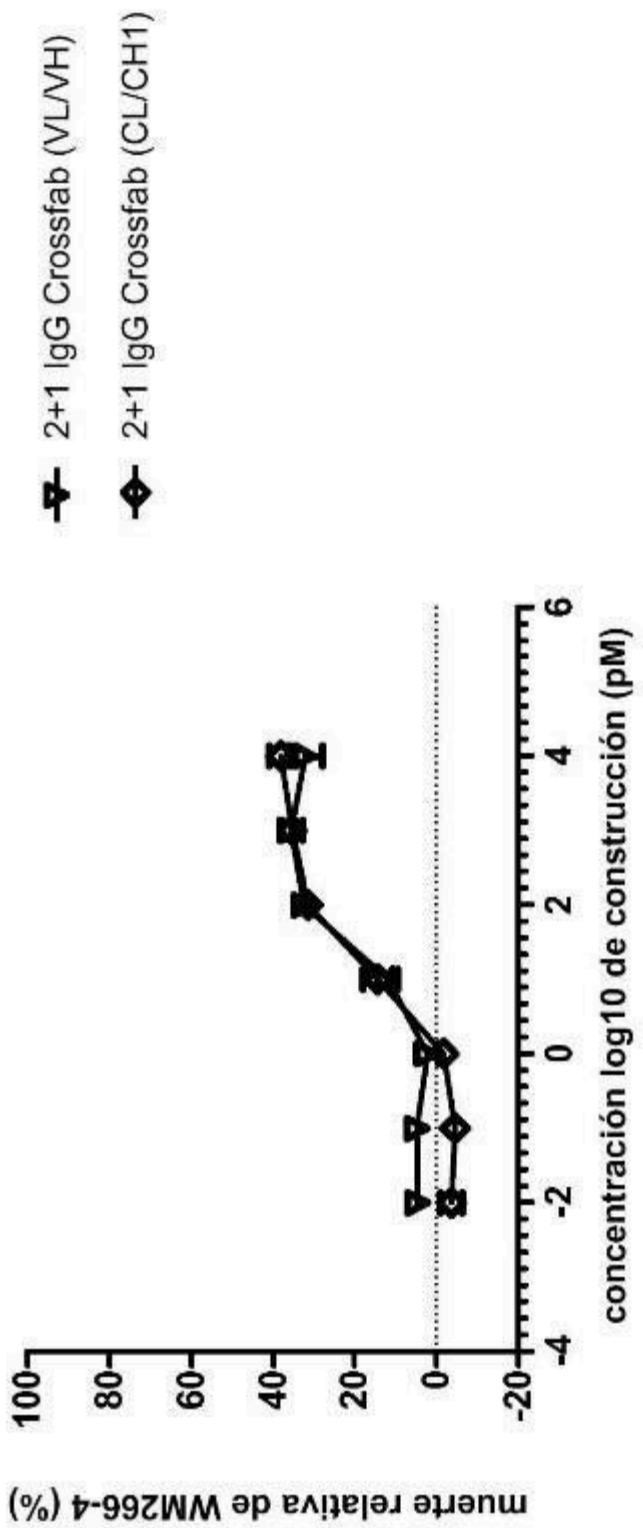

2+1 IgG Crossfab (VL/VH)
2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)
muerte relativa de WM266-4 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-4
-2
0
2
4
6
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 62

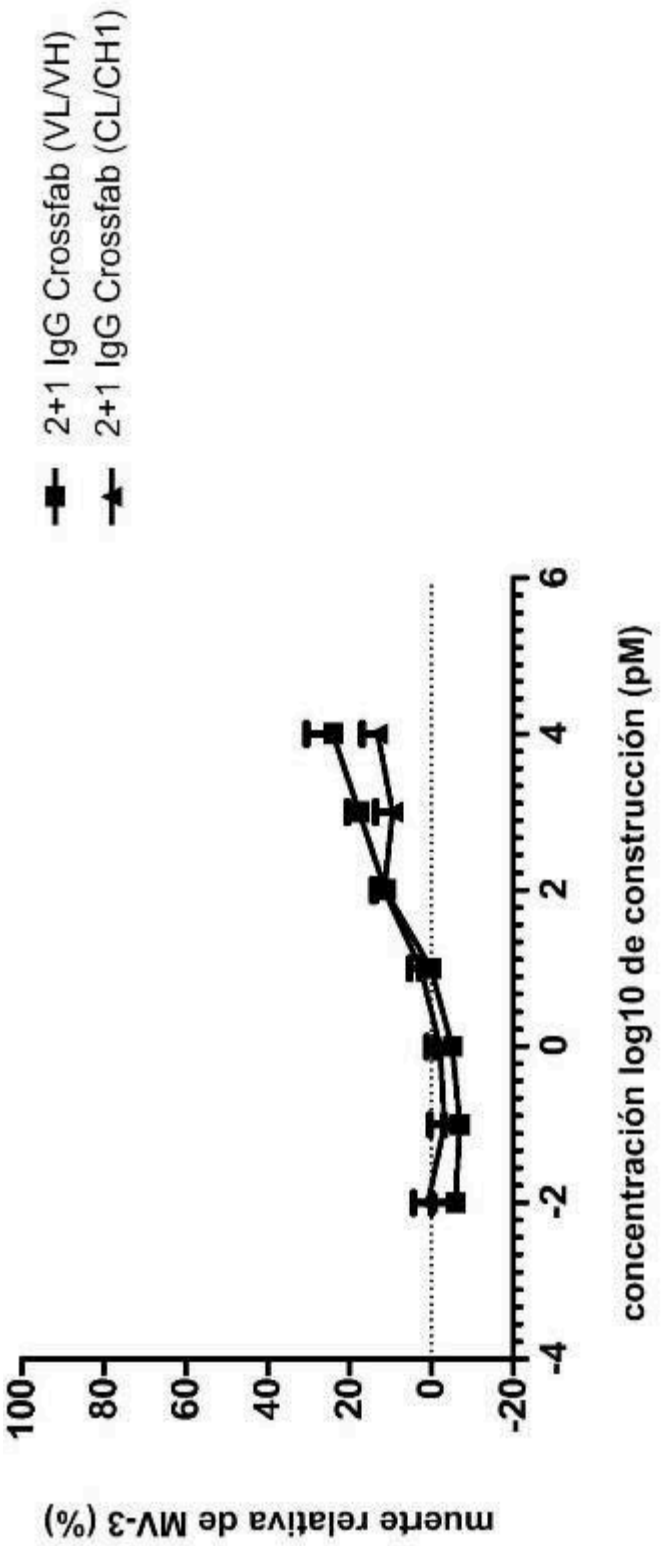

2+1 IgG Crossfab (VL/VH)
2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)
muerte relativa de MV-3 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-4
-2
0
2
4
6
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 63

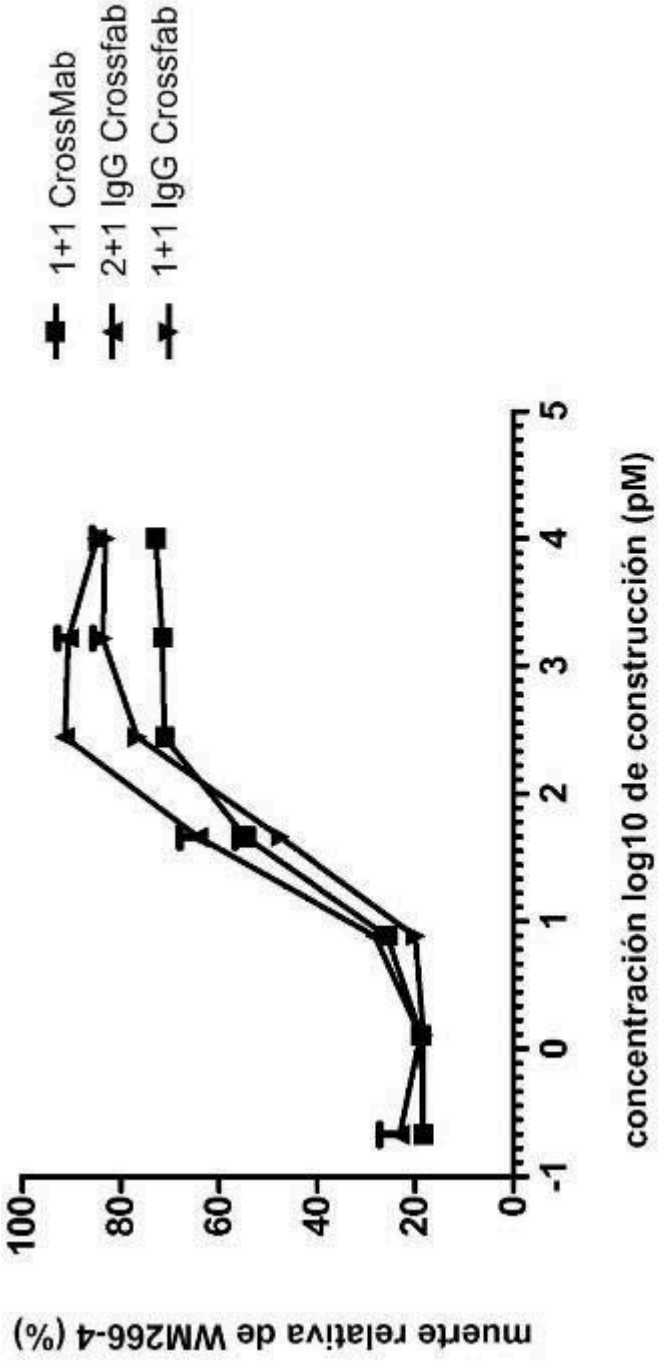

1+1 CrossMab
2+1 IgG Crossfab
1+1 IgG Crossfab
muerte relativa de WM266-4 (%)
100
80
60
40
20
0
-1
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 64A

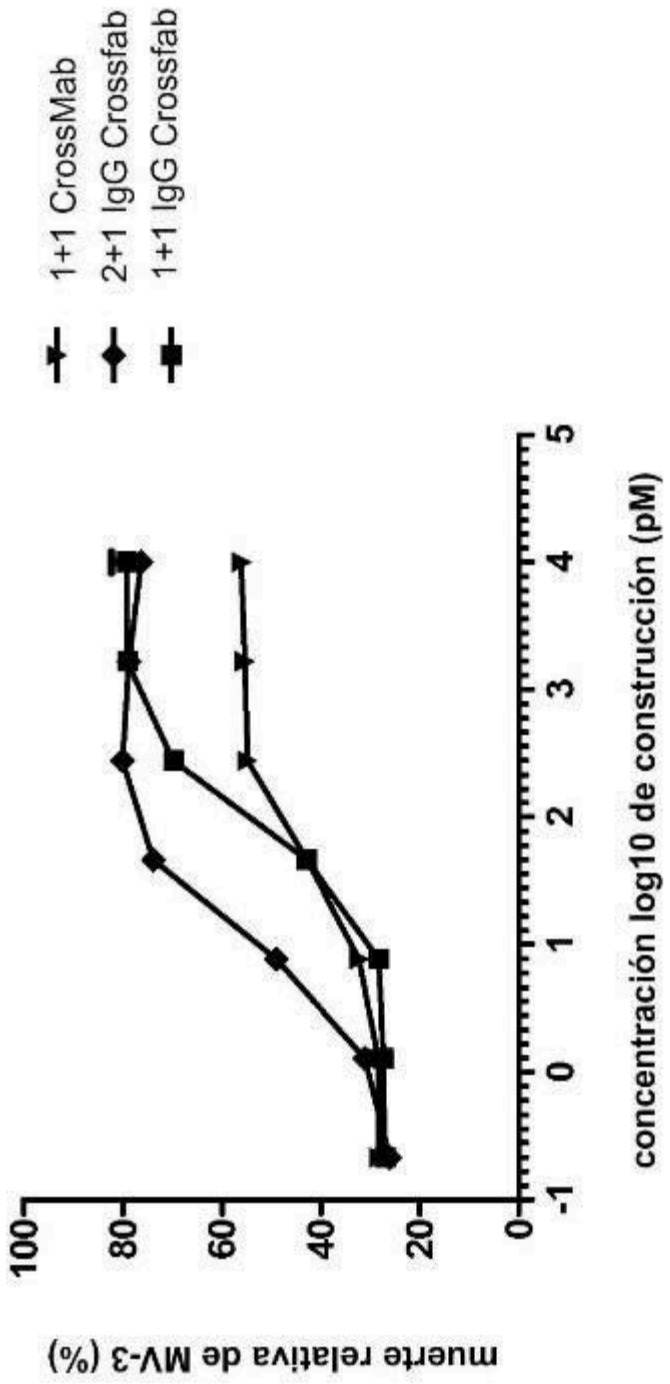

1+1 CrossMab
2+1 IgG Crossfab
1+1 IgG Crossfab
muerte relativa de MV-3 (%)
0
20
40
60
80
100
-1
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 64B

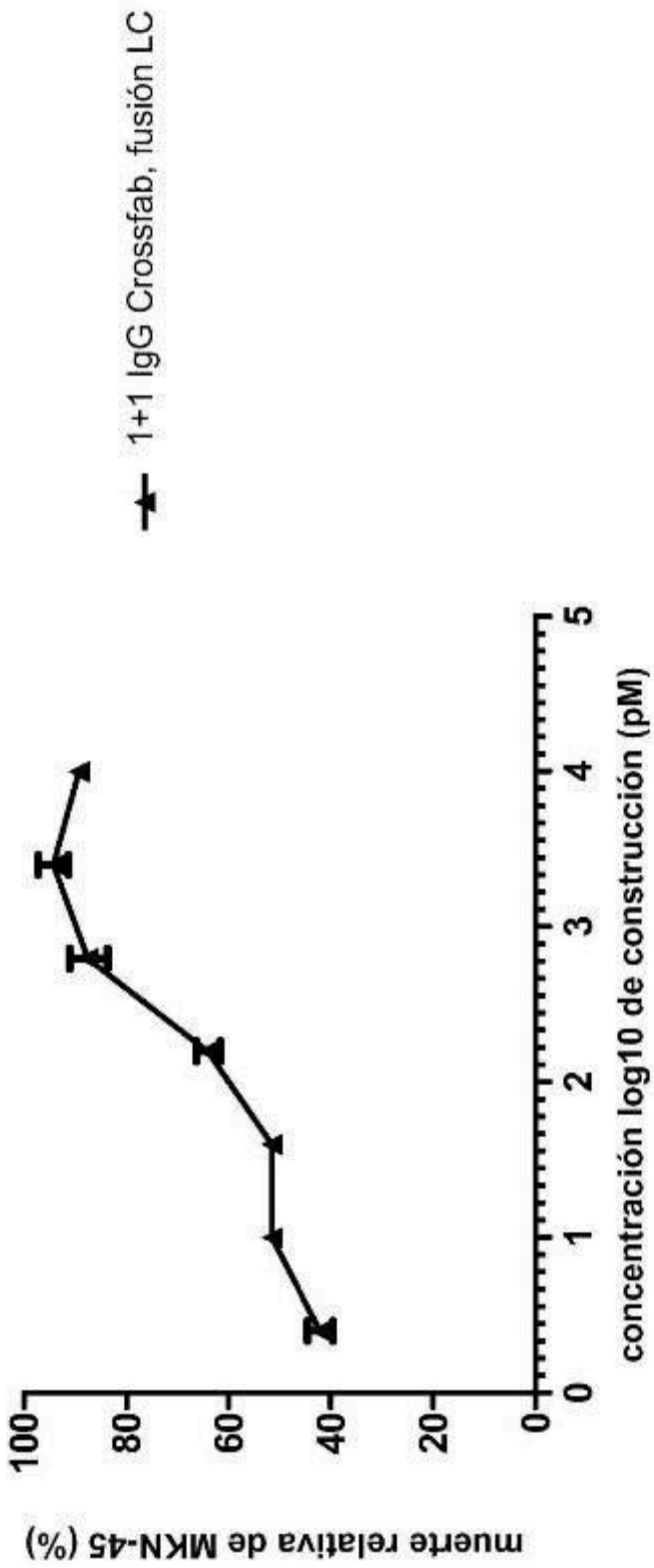

1+1 IgG Crossfab, fusión LC
muerte relativa de MKN-45 (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 65A

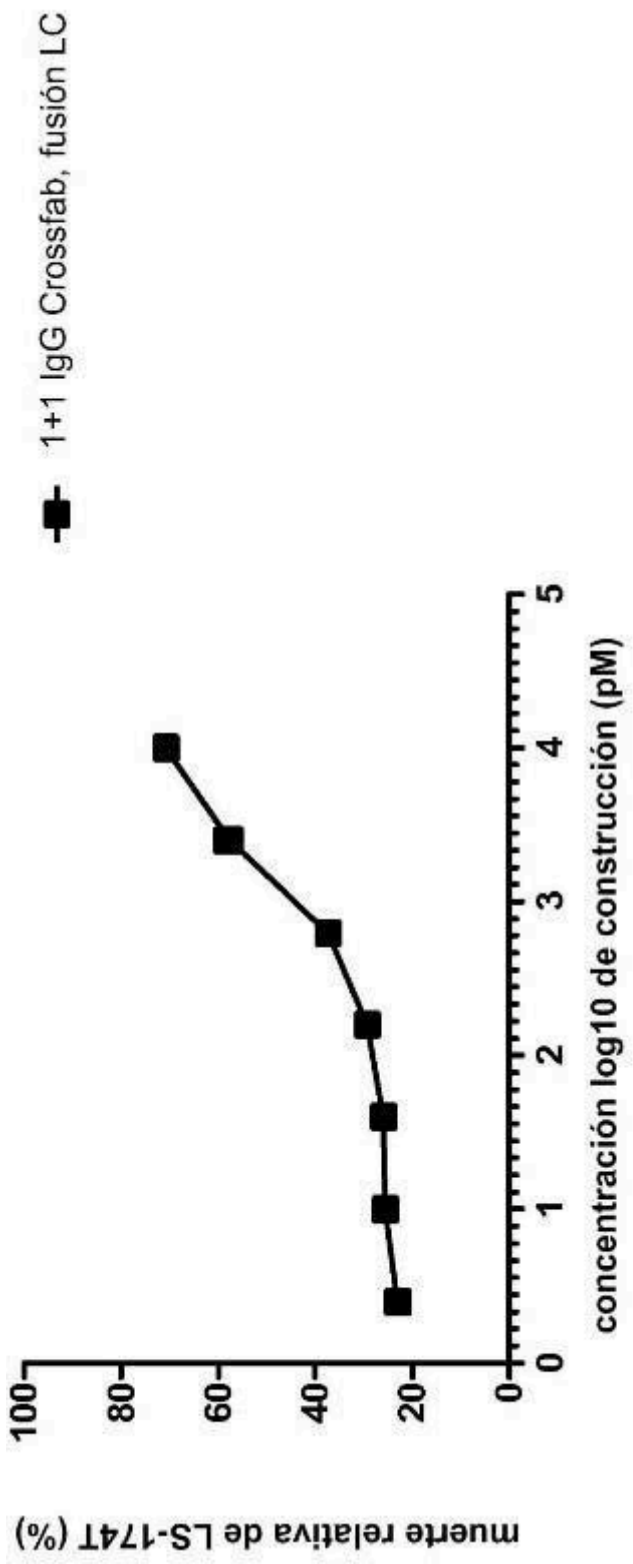

1+1 IgG Crossfab, fusión LC
muerte relativa de LS-174T (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 65B

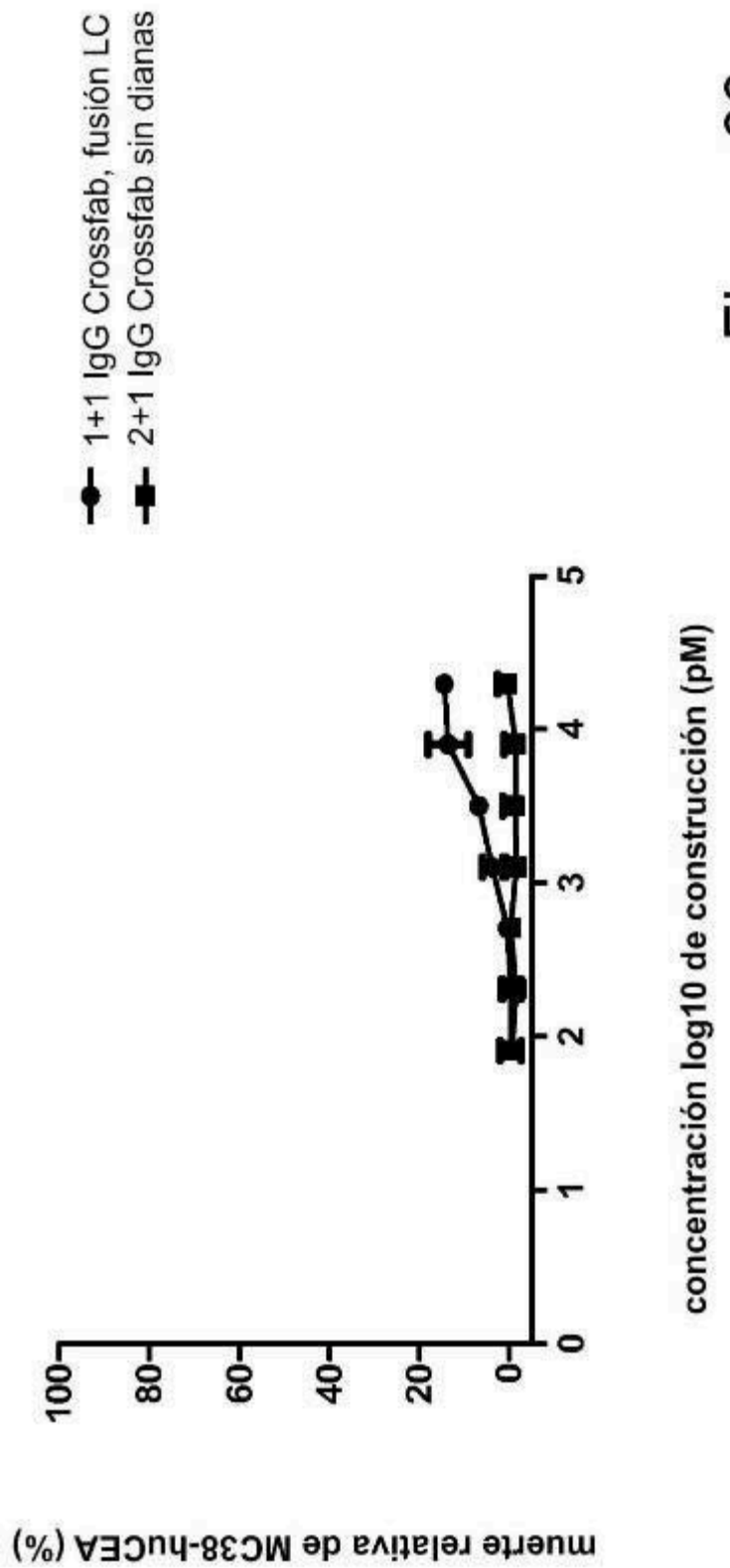

1+1 IgG Crossfab, fusión LC
2+1 IgG Crossfab sin dianas
muerte relativa de MC38-huCEA (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 66

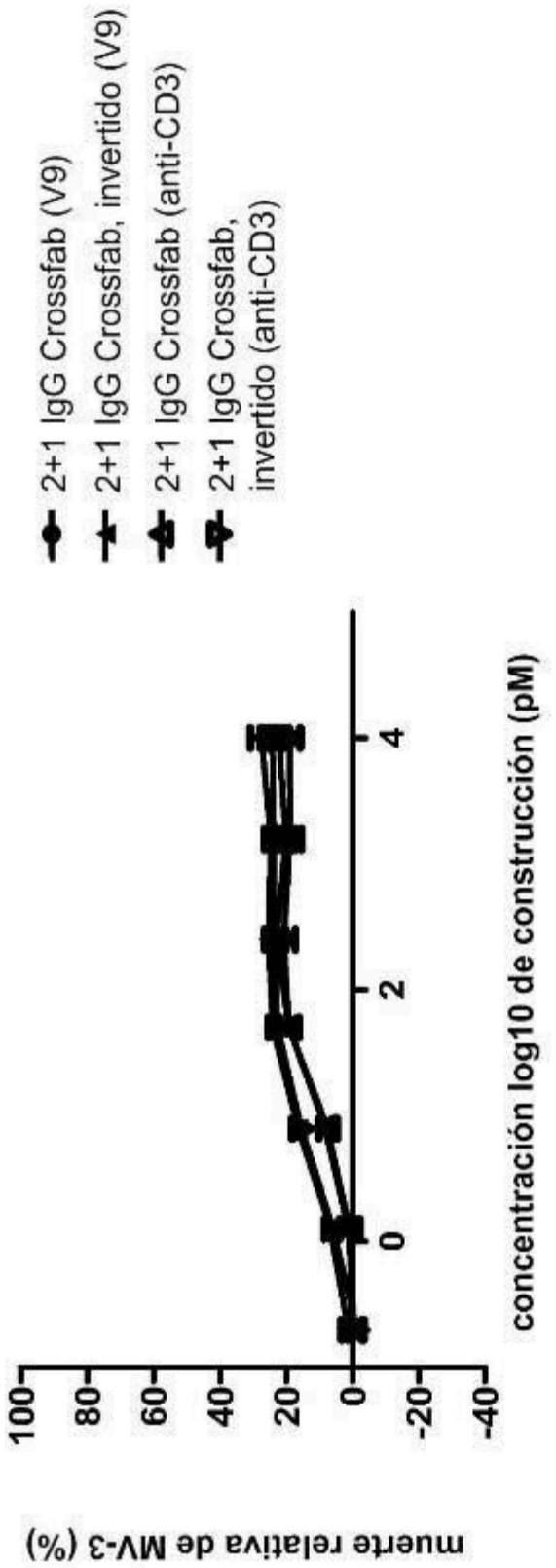

2+1 IgG Crossfab (V9)
2+1 IgG Crossfab, invertido (V9)
2+1 IgG Crossfab (anti-CD3)
2+1 IgG Crossfab, invertido (anti-CD3)
muerte relativa de MV-3 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
0
2
4
concentración log10 de construcción (pM)

Figura 67A

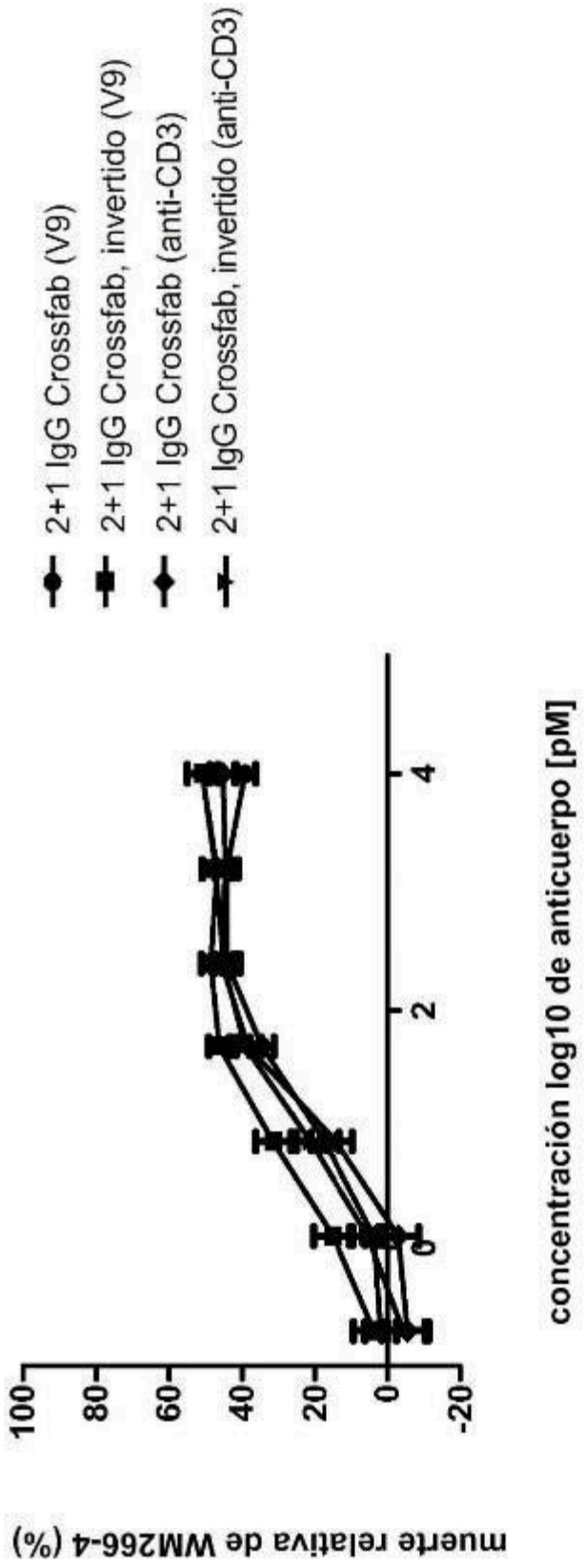

2+1 IgG Crossfab (V9)
2+1 IgG Crossfab, invertido (V9)
2+1 IgG Crossfab (anti-CD3)
2+1 IgG Crossfab, invertido (anti-CD3)
muerte relativa de WM266-4 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-4
0
2
4
concentración log10 de anticuerpo [pM]

Figura 67B