(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 667 100**

(51) Int. CI.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2011 PCT/US2011/045922**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12018687**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2011 E 11815113 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2601216**

(54) Título: **Diacuerpos covalentes y sus usos**

(30) Prioridad:

02.08.2010 US 370046 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2018

(73) Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US

(72) Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE S.;
HUANG, LING y
RAINEY, GODFREY JONAH ANDERSON

(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

Diacuerpos covalentes y sus usos

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a las moléculas de diacuerpo, a las que también se les conoce como "reactivos de redireccionamiento de doble afinidad" ("DART"), y los usos de estos para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo trastornos inmunológicos y cánceres. Las moléculas de diacuerpo de la invención consisten en al menos dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión a epítopo, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes. Además, los epítopos pueden ser de las mismas moléculas o diferentes o estar ubicados en las mismas células o diferentes. Las cadenas polipeptídicas individuales de la molécula de diacuerpo pueden estar unidas de manera covalente mediante enlaces covalentes que no sean enlaces peptídicos, incluyendo pero sin limitarse a, enlaces disulfuro de residuos de cisteína ubicados dentro de cada cadena polipeptídica. En las realizaciones específicas, las moléculas de diacuerpo de la presente invención además comprenden una región Fc, que permite que la funcionalidad tipo anticuerpo sea manipulada por ingeniería en la molécula.

2. Antecedentes de la invención

El diseño de los diacuerpos covalentes se basa en el constructo del fragmento Fv monocatenario (scFv) (Holliger *et al*. (1993) *'"Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448. En una molécula de IgG no modificada, intacta, los dominios VL y VH se ubican en diferentes cadenas polipeptídicas, es decir, la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. La interacción de una cadena ligera del anticuerpo y una cadena pesada del anticuerpo y, en particular, la interacción de los dominios VL y VH forma uno de los sitios de unión a epítopo del anticuerpo. Por el contrario, el constructo scFv comprende un dominio VL y VH de un anticuerpo contenido en una sola cadena polipeptídica, en donde los dominios están separados por un ligador flexible de suficiente longitud para permitir el autoensamblaje de los dos dominios para dar un sitio de unión a epítopo funcional. Cuando el autoensamblaje es imposible debido a un ligador de insuficiente longitud (menos de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos), dos de los constructos scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente, asociándose la región VL de una cadena con la región VH de la otra (revisado en Marvin *et al*. (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*" Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Más aún, la adición de un residuo de cisteína al extremo C-terminal del constructo ha demostrado permitir los enlaces disulfuro de las cadenas polipeptídicas, estabilizando el dímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente (véase, por ejemplo, Olafsen *et al*. (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27). Además, cuando se seleccionan los dominios VL y VH de diferente especificidad, no solo es posible construir una molécula bivalente, sino también biespecífica.

Los diacuerpos bivalentes tienen una amplia gama de aplicaciones que incluyen terapia e inmunodiagnóstico. La bivalencia permite tener gran flexibilidad en el diseño y la manipulación por ingeniería del diacuerpo en diversas aplicaciones, proporcionando mejor avidez ante los antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos y la orientación dirigida a tipos específicos de células basándose en la presencia de ambos antígenos diana. Por su valencia aumentada, bajas velocidades de disociación y aclaramiento rápido de la circulación (para diacuerpos de pequeño tamaño, en o por debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han demostrado un uso particular en el campo de la obtención de imágenes de tumores (Fitzgerald *et al*. (1997) "*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*", Protein Eng. 10: 1221). De importancia particular es la reticulación de diferentes células, por ejemplo, la reticulación de células T citotóxicas con células tumorales (Staerz *et al*. (1985) "*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*", Nature 314:628-631, y Holliger *et al*. (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng. 9:299-305). Los dominios de unión a epítopo de diacuerpos también pueden dirigirse a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria, como pueden ser los determinantes CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (células NK, *natural killer*) u otras células mononucleares. En múltiples estudios, también se encontró que la unión de los diacuerpos a los determinantes de células efectoras, por ejemplo, los receptores de Fcγ (FcγR), activan las células efectoras (Holliger *et al*. (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng. 9:299-305; Holliger *et al*. (1999) "*Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins*", Cancer Res. 59:2909-2916). Por lo regular, la activación de células efectoras se desencadena por la unión de un anticuerpo unido al antígeno a una célula efectora a través de la interacción Fc-FcγR; por tanto, en este sentido, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden presentar funcionalidad de tipo Ig independientemente de si estas contienen un dominio Fc (por ejemplo, tal como se evaluó en algún ensayo de la función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en el presente documento (por ejemplo, el ensayo ADCC)). Mediante la reticulación o de células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo lleva la célula efectora a las proximidades de las células tumorales sino que conduce a la aniquilación eficaz del tumor (véase, por ejemplo, Cao *et al*. (2003) "*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55: 171-197.

2.1 RECEPTORES DE CÉLULAS EFECTORAS Y SUS PAPELES EN EL SISTEMA INMUNITARIO

En la función inmunitaria tradicional, la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario da como resultado una amplia variedad de respuestas, abarcando desde las funciones efectoras como puede ser la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis ante señales inmunomoduladoras, como puede ser la regulación de la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o complejos inmunitarios a receptores de superficie de células especializadas en células hematopoyéticas. La diversidad de las respuestas celulares desencadenadas por los anticuerpos y los complejos inmunitarios resulta de la heterogeneidad estructural de los receptores de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión a antígeno estructuralmente relacionados que supuestamente median en la señalización intracelular.

Los receptores de Fcγ, miembros de la superfamilia de proteínas de los genes de inmunoglobulina son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la parte Fcγ de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos mediante un dominio de reconocimiento en la cadena alfa del receptor de Fcγ. Los receptores de Fcγ se definen por su especificidad para los subtipos de inmunoglobulina. Los receptores de Fcγ para IgG se conocen como FCγR, para IgE como FcεR, y para IgA como FcαR. Diferentes células auxilares portan receptores de Fcγ para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células auxilares estarán involucradas en una respuesta determinada (revisado por Ravetch J.V. *et al*. (1991) "*Fc Receptors*", Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. et. al. (2001) "*Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fcgamma Receptors*", Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. *et al*. (2002), "*ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation*", The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. *et al*. (2000) "*Immune Inhibitory Receptors*", Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. *et al*, (2001) "*IgG Fc Receptors*" Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) "*Fc Receptors: Rubor Redux*", Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores de Fcγ, las células que los expresan y su especificidad por el isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptado de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4ª ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores de Fcγ

Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de membrana, que presenta dominios extracelulares relacionados con un conjunto de tipo C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un solo dominio transmembrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Estos son tres FCγR conocidos, denominados FCγRI(CD64), FCγRII(CD32) y FCγRIII(CD16). Los tres receptores están codificados por distintos genes; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgieron de un progenitor común, tal vez por duplicación génica.

FCγRII(CD32)

Las proteínas FCγRII son glicoproteínas integrales de membrana de 40 kDa que se unen solo a la IgG complejada debido a una baja afinidad para Ig monomérica (10^6 M^{-1}). Este receptor es el receptor FCγR que se expresa más ampliamente, presente en todas las células hematopoyéticas, incluidos los monocitos, macrofagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. El receptor FCγRII solo tiene dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y por tanto una afinidad mucho menor para IgG que para FCγRI. Existen tres genes de FCγRII humanos (FCγRII-A, FCγRII-B, FCγRII-C), todos que se unen a la IgG en agregados o complejos inmunitarios.

Distintas diferencias dentro de los dominios citoplásmicos de FCγRII-A y FCγRII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas ante la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que da origen a activación celular como puede ser fagocitosis y estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibidoras, por ejemplo, inhiben la activación de células B.

FCγRIII (CD16)

Por la heterogeneidad de esta clase, el tamaño de FCγRIII abarca entre 40 y 80 kDa en ratón y humano. Dos genes humanos codifican dos transcritos, FCγRIIIA, una glicoproteína integral de membrana, y FCγRIIIB, una versión unida a glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen murino codifica un receptor FCγRIII homólogo para FCγRIIIA humano transmembrana. El receptor FCγRIII comparte características estructurales con cada uno de los dos FCγR. Al igual que FCγRII, FCγRIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los dos dominios de tipo Ig extracelulares correspondientes. FCγRIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos y el único FCγR en células NK. Actualmente se sabe que FCγRIIIB unido a GPI se expresa solo en neutrófilos humanos.

Señalización a través de los FCγR

Las señales de activación e inhibidoras son transducidas a través de los FCγR tras la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas de los receptores. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmicos del receptor denominados motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores (ITAM) o motivos de inhibición basados en tirosina de inmunoreceptores (ITIM) justifican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplásmicas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FCγR. Los complejos FCγR que contienen ITAM incluyen FCγRI, FCγRIIA, FCγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen FCγRIIB.

Los neutrófilos humanos expresan el gen de FCγRIIA. El agrupamiento de FCγRIIA a través de complejos inmunitarios o reticulación de anticuerpos específicos sirve para agregar los ITAM junto con las cinasas asociadas a receptores que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de los ITAM sirve como sitio de acoplamiento para la cinasa Syk, la activación de que da como resultado la activación de sustratos posteriores (por ejemplo, PI_3K). La activación celular da origen a la liberación de mediadores proinflamatorios.

El gen de FCγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es idéntico al 96% a FCγRIIA y se une a los complejos de IgG de manera casi idéntica. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FCγRIIB define esta subclase inhibitoria de FCγR. En fechas recientes se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se coliga junto con un FCγR activador, el ITIM de FCγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros del fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasa mediada por FCγR que contiene ITAM, impidiendo por consiguiente el flujo de entrada de Ca^{++} intracelular. De este modo, la reticulación de FCγRIIB atenúa la respuesta activadora a la ligación de FCγR e inhibe la respuesta celular. De este modo se cancela la activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de los anticuerpos.

TABLA 1. Receptores para las regiones Fc de los isotipos de inmunoglobulina

Receptor	Unión	Tipo de célula	Efecto de la ligación
FcγRI (CD64)	IgG1 10^8 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Captación, estimulación Activación del estallido respiratorio Inducción de aniquilación
FcγRII-A (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhan	Captación, liberación de gránulos
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación, inhibición de la estimulación
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Células B Mastocitos	Sin captación Inhibición de la estimulación
FcγRIII (CD16)	IgG1 5×10^5 M^{-1}	Células NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Inducción de aniquilación
FcεRI	IgE 10^{10} M^{-1}	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Secreción de gránulos
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación, inducción de aniquilación

El documento US2010/174053 analiza moléculas de diacuerpo y sus usos en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, incluidos trastornos inmunológicos, enfermedad infecciosa, intoxicación y cánceres. Las moléculas de diacuerpo comprenden dos cadenas polipéptidicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión a epítopo, que puede reconocer los mismos epítopos o diferentes en los mismos antígenos o diferentes.

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los diacuerpos covalentes y/o moléculas de diacuerpo covalentes y a su uso en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo cáncer, trastornos autoinmunitarios, trastornos alérgicos y enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, hongos o virus. Preferiblemente, el diacuerpo de la presente invención puede unirse a dos epítopos diferentes en dos células diferentes en donde el primer epítopo se expresa en un tipo de célula diferente a la del segundo epítopo, de modo que el diacuerpo puede unir las dos células.

En una realización, la presente invención se refiere a un complejo de diacuerpo capaz de unirse a albúmina sérica, en el que dicho complejo de diacuerpo comprende tres cadenas polipeptídicas que comprenden, cada una, un extremo N-terminal y un extremo C-terminal, en el que:

(A) dichas cadenas polipeptídicas primera y segunda se unen de manera covalente entre sí mediante un enlace disulfuro, y comprenden cada una, en el sentido de N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena ligera unido a un dominio variable de cadena pesada, en el que:

(1) dicho dominio variable de cadena ligera (también denominado primer dominio) de dicha primera cadena polipeptídica se asocia con dicho dominio variable de cadena pesada (también denominado quinto dominio) de dicha segunda cadena para formar un sitio de unión específico para un primer epítopo; y

(2) dicho dominio variable de cadena ligera (también denominado cuarto dominio) de dicha segunda cadena polipeptídica se asocia con dicho dominio variable de cadena pesada (también denominado segundo dominio) de dicha primera cadena para formar un sitio de unión específico para un segundo epítopo;

(B) dicha primera cadena polipeptídica comprende una parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero, estando situada dicha parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero de manera C-terminal respecto a dicho dominio variable de cadena pesada de dicha primera cadena polipeptídica, y siendo un ovillo E o un ovillo K, en el que dicho ovillo E son 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK (ID SEC NO: 299), y dicho ovillo K son 4 repeticiones heptaméricas de KVAALKE (ID SEC NO:300); y

(C) dicha tercera cadena polipeptídica comprende una parte polipeptídica de una proteína capaz de unirse a dicha albúmina sérica, y una parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero que es:

(1) un ovillo E (ID SEC NO: 299) si dicha primera cadena polipeptídica comprende un ovillo K (ID SEC NO: 300), o

(2) un ovillo K (ID SEC NO: 300) si dicha primera cadena polipeptídica comprende un ovillo E (ID SEC NO: 299);

en el que dicha parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero de dichas cadenas polipeptídicas primera y tercera se complejan juntas para formar de ese modo dicho complejo de diacuerpo, y dicho complejo de diacuerpo es capaz de unirse simultáneamente a dicho primer epítopo, a dicho segundo epítopo y a dicha albúmina sérica.

En ciertos aspectos de la invención el primer epítopo, segundo epítopo, y cuando proceda, el tercer epítopo y cuarto epítopo pueden ser el mismo. En otros aspectos, el primer epítopo, segundo epítopo, y cuando proceda, el tercer epítopo y cuarto epítopo pueden cada uno ser diferente entre sí. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un tercer dominio de unión a epítopo, el primer epítopo y el tercer epítopo pueden ser el mismo. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un tercer dominio de unión a epítopo, el primer epítopo y el tercer epítopo pueden ser el mismo. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un cuarto dominio de unión a epítopo, el primer epítopo y el cuarto epítopo pueden ser el mismo. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un tercer dominio de unión a epítopo, el segundo epítopo y el tercer epítopo pueden ser el mismo. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un cuarto dominio de unión a epítopo, el segundo epítopo y el cuarto epítopo pueden ser el mismo. En aspectos preferidos de la invención, el primer epítopo y el segundo epítopo son diferentes. En todavía otros aspectos de la invención que comprenden un tercer dominio de unión a epítopo y un cuarto dominio de unión a epítopo, el tercer epítopo y el cuarto epítopo pueden ser diferentes. Debe entenderse que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente invención.

En aspectos específicos de la invención, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o la molécula de diacuerpo pueden derivarse de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o la molécula de diacuerpo pueden derivarse de la misma inmunoglobulina. En todavía otro aspecto, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o la molécula del diacuerpo pueden derivarse de una inmunoglobulina diferente. En todavía otro aspecto, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o la

molécula del diacuerpo pueden derivarse de una inmunoglobulina diferente. Debe entenderse que cualquier combinación de lo anterior está comprendida en la presente invención. El complejo de diacuerpo también puede comprender un tercer dominio y un sexto dominio.

En ciertos aspectos de la invención, la unión covalente entre la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo o molécula de diacuerpo puede ser a través de un enlace disulfuro entre al menos un residuo de cisteína en la primera cadena polipeptídica y al menos un residuo de cisteína en la segunda cadena polipeptídica. Los residuos de cisteína en la primera o segunda cadenas polipeptídicas que son responsables de los enlaces disulfuro pueden encontrarse en cualquier parte en la cadena polipeptídica así como dentro del primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto dominios. En una realización específica, el residuo de cisteína en la primera cadena polipeptídica se encuentra en el primer dominio y el residuo de cisteína en la segunda cadena polipeptídica se encuentra en el quinto dominio. El primer, segundo, cuarto y quinto dominios corresponden a las regiones variables responsables de la unión. En las realizaciones preferidas, los residuos de cisteína responsables de los enlaces disulfuro entre las cadenas polipeptídicas primera y segunda se ubican dentro del tercer y sexto dominios, respectivamente. En un aspecto particular de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23), que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 17). En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23), que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 17). En todavía otro aspecto de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (ID SEC NO: 77), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y que pueden estar codificados por la secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 78). En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (ID SEC NO: 77), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 78). En ciertos aspectos de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (ID SEC NO: 77). En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (ID SEC NO: 77). En todavía otros aspectos de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio bisagra. En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio bisagra. En todavía otros aspectos de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23); y el sexto dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio Fc, o una parte de éste. En todavía otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc, o una parte de éste.

En otras realizaciones, los residuos de cisteína en la primera o segunda cadena polipeptídica que son responsables de los enlaces disulfuro pueden estar ubicados fuera del primer, segundo o tercer dominios en la primera cadena polipeptídica y fuera del cuarto, quinto y sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica. En particular, el residuo de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al primer dominio o puede ser C-terminal respecto al primer dominio. El residuo de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal respecto al segundo dominio. El residuo de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal respecto al tercer dominio. Además, el residuo de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal respecto al cuarto dominio. El residuo de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal respecto al quinto dominio. Por consiguiente, el residuo de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede ser C-terminal respecto al sexto dominio o puede ser N-terminal respecto al sexto dominio. En un aspecto particular, el enlace disulfuro puede estar entre al menos dos residuos de cisteína en la primera cadena polipeptídica y al menos dos residuos de cisteína en la segunda cadena polipeptídica. En un aspecto particular, en donde el tercer dominio y el sexto dominio no comprenden un dominio Fc, o una parte de éste, el residuo de cisteína puede estar en el extremo C-terminal de la primera cadena polipeptídica y en el extremo C-terminal de la segunda cadena polipeptídica. Debe entenderse que cualquier combinación de lo anterior está comprendida en la presente invención.

En las realizaciones específicas de la invención descritas anteriormente, el diacuerpo covalente de la invención abarca dímeros de moléculas de diacuerpo, en donde cada molécula de diacuerpo consiste en una primera y una segunda cadenas polipeptídicas. En ciertos aspectos de esta realización, las moléculas de diacuerpo pueden estar unidas de manera covalente para formar el dímero, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico. En los aspectos de esta realización, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un residuo de cisteína en la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo del dímero. En todavía

aspectos más preferidos de esta invención, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un residuo de cisteína en la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo que forman el dímero, en donde el al menos un residuo de cisteína está ubicado en el tercer dominio de cada primer cadena polipeptídica.

El primer dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal respecto al segundo dominio. Además, el segundo dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal respecto al tercer dominio. Por consiguiente, el tercer dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al primer dominio o puede ser C-terminal respecto al primer dominio. El tercer dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal respecto al segundo dominio. El cuarto dominio puede ser N-terminal respecto al sexto dominio o puede ser C-terminal respecto al sexto dominio. El quinto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al sexto dominio o puede ser C-terminal respecto al sexto dominio. Por consiguiente, el sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal respecto al cuarto dominio. El sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal respecto al quinto dominio. Debe entenderse que cualquier combinación de lo anterior está comprendida en la presente invención.

En ciertas realizaciones, el primer dominio y el segundo dominio pueden estar ubicados de manera C-terminal respecto al tercer dominio en la primera cadena polipeptídica; o el primer dominio y el segundo dominio pueden estar ubicados de manera N-terminal respecto al tercer dominio en la primera cadena polipeptídica. Con respecto a la segunda cadena polipeptídica, el cuarto dominio y el quinto dominio pueden estar ubicados de manera C-terminal respecto al sexto dominio, o el cuarto dominio y el quinto dominio pueden estar ubicados de manera N-terminal respecto al sexto dominio.

Como se comentó en lo anterior, los dominios en las cadenas polipeptídicas individuales están unidos de manera covalente. En aspectos específicos, la unión covalente entre el primer y segundo dominio, el primer y tercer dominio, el segundo y tercer dominio, el cuarto y quinto dominio, el cuarto y sexto dominio, y/o el quinto y sexto dominio puede ser un enlace peptídico. En particular, el primero y segundo dominios, y el cuarto y quinto dominios pueden estar separados por el tercer dominio y sexto dominio, respectivamente, o por residuos de aminoácidos adicionales, a condición de que el primero y segundo, y el cuarto y quinto dominios no se asocien para formar un sitio de unión. El número de residuos de aminoácido puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de aminoácido. En un aspecto preferido, el número de residuos de aminoácido entre los dominios es 8.

En ciertos aspectos de la invención, los dominios de la primera y segunda cadenas polipeptídicas que contienen un dominio Fc, es decir, como opción, el tercer y sexto dominios, respectivamente, además pueden contener un dominio bisagra de modo que el dominio contenga una región bisagra-Fc. En realizaciones alternativas, la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica pueden contener un dominio bisagra sin contener también un dominio Fc. Las cadenas pesadas, cadenas ligeras, regiones bisagra, dominios Fc y/o dominios bisagra-Fc para utilizarlas en la invención pueden obtenerse de cualquier tipo de inmunoglobulina, como puede ser IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En un aspecto preferido, el tipo de inmunoglobulina es IgG, o cualquier subtipo de esta, es decir, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4. En otros aspectos, la inmunoglobulina de la que se obtienen las cadenas ligeras y pesadas está humanizada o quimerizada.

Además, el primer epítopo y el segundo epítopo y cuando proceda, el tercer epítopo y el cuarto epítopo, a que se une el diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden ser diferentes epítopos del mismo antígeno o pueden ser diferentes epítopos de antígenos diferentes. Los antígenos pueden ser cualquier molécula contra que se pueda generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunitarios, proteínas virales, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, como puede ser una célula B, una célula T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (célula NK) o una célula dendrítica.

En ciertos aspectos de la presente realización, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo o molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc, receptor de Fc que puede ser un receptor de Fc activador o un receptor de Fc inhibidor. En aspectos particulares, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ, y el receptor de Fcγ es un receptor FCγRI, FCγRII o FCγRIII. En aspectos más preferidos, el receptor FCγRIII es un receptor FCγRIIIA (CD16A) o el receptor FCγRIIIB (CD16B), y más preferiblemente, el receptor FCγRIII es el receptor FCγRIIIA (CD16A). En otro aspecto preferido, el receptor FCγRII es el receptor FCγRIIA (CD32A) o el receptor FCγRIIB (CD32B), y más preferiblemente, el receptor FCγRIIB (CD32B). En un aspecto particularmente preferido, un sitio de unión del diacuerpo es específico para CD32B y el otro sitio de unión es específico para CD16A. En una realización específica de la invención, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo o molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc activador y al menos otro sitio es específico para un receptor de Fc inhibidor. En ciertos aspectos de esta realización, el receptor de Fc activador es CD32A y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otros aspectos de esta realización, el receptor de Fc activador es BCR y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En todavía otros aspectos de esta realización, el receptor de Fc activador es IgERI y el receptor de Fc inhibidor es CD32B.

En casos en los que un sitio de unión a epítopo es específico para CD16A, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo 3G8 murino, cuya secuencia ha sido clonada y se establece en el presente documento. En otros casos en los que un sitio de unión a epítopo es específico para CD32A, los dominios VL y VH pueden ser iguales a o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo IV.3 murino. En todavía otros casos en los que un sitio de unión a epítopo es específico para CD32B, los dominios VL y VH pueden ser los mismos que o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo 2B6 murino, cuya secuencia ha sido clonada y se establece en el presente documento. Debe entenderse que cualquiera de los dominios VL o VH de los anticuerpos 3G8, 2B6 e IV.3 puede utilizarse en cualquier combinación. La presente invención también se refiere a un diacuerpo o molécula de diacuerpo biespecífico, en donde el primer epítopo es específico para CD32B, y el segundo epítopo es específico para CD16A.

En otros aspectos, un sitio de unión a epítopo puede ser específico para un antígeno patógeno. Como se utiliza en el presente documento, un antígeno patógeno es un antígeno implicado en una enfermedad patógena específica, como puede ser cáncer, infección y enfermedad autoinmunitaria. Por tanto, el antígeno patógeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, un antígeno viral o un antígeno autoinmunitario. Los antígenos patógenos a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a, lipopolisacárido, antígenos virales seleccionados de grupo que consiste en antígenos virales de virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus sinsicial respiratorio, virus del Nilo Occidental (por ejemplo, los antígenos E16 y/o E53) y virus de hepatitis, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y colágeno. Preferiblemente, el antígeno patógeno es un antígeno neutralizante. En un aspecto preferido, cuando un sitio de unión a epítopo es específico para CD16A o CD32A, el otro sitio de unión a epítopo es específico para un antígeno patógeno, excluidos los antígenos autoinmunitarios. En todavía otro aspecto preferido, cuando un sitio de unión a epítopo es específico para CD32B, el otro sitio de unión a epítopo es específico para cualquier antígeno patógeno. En realizaciones específicas, la molécula de diacuerpo de la invención une dos antígenos diferentes en la misma célula, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno es específico para un receptor de Fc activador, mientras que el otro es específico para un receptor de Fc inhibidor. En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo une dos epítopos neutralizantes virales diferentes, por ejemplo, pero sin limitarse a, E16 y E53 del virus del Nilo Occidental.

En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica según la reivindicación 12 del presente documento.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13 del presente documento.

3.1 DEFINICIONES

A menos que se indique de otro modo, todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos científicos o terminología que se utilizan en el presente documento están destinados a tener los significados comúnmente comprendidos por los expertos en la técnica a que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento para propósitos de claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no necesariamente debe ser considerada que representa una diferencia considerable en lo que se comprende comprendido en la técnica. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de la biología molecular (así como las técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que están dentro de las habilidades de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, incluyendo Current Protocols in Immunology (J. *E. coli*gan *et al*., eds., 1999, incluidos suplementos hasta 2001); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al*., eds., 1987, incluidos suplementos hasta 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook and Russel, 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al*., eds., 1994); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert, y N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; y Beaucage *et al*. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000).

Como se utilizan en el presente documento, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, fragmentos Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab’), fragmentos Fv biespecíficos unidos por enlaces disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id frente a los anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos con actividad inmunológica de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) o subclase.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “se une de manera inmunoespecífica” “reconoce de manera

inmunoespecífica", "se une específicamente", "reconoce específicamente" y términos análogos se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, epítopo o complejo inmunitario) y no se une específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad tal como se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no tienen reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden ser identificadas, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, "complejo inmunitario" se refiere a una estructura que se forma cuando al menos una molécula diana y al menos un polipéptido que contenga la región Fcγ heterólogo se une a otro formando un complejo de mayor peso molecular. Ejemplos de los complejos inmunitarios son los complejos antígeno-anticuerpo que pueden ser solubles o particulados (por ejemplo, un complejo antígeno/anticuerpo en una superficie celular.).

Como se utilizan en el presente documento, los términos "cadena pesada", "cadena ligera", "región variable", "región de entramado", "dominio constante" y similares, tienen su significado común en la técnica inmunológica y se refieren a los dominios en las inmunoglobulinas naturales y los dominios correspondientes de las proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes) (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales (por ejemplo, la IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, normalmente expresadas como una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La parte amino-terminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La parte carboxilo-terminal ("C") de cada cadena define una región constante, teniendo las cadenas ligeras un solo dominio constante y teniendo normalmente las cadenas pesadas tres dominios constantes y una región bisagra. Por tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-V_L-C_L-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-c (donde H es la región bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones determinantes de la complementariedad (las CDR), que contienen los residuos que hacen contacto con el antígeno y segmentos que no son CDR, a los que se conoce como segmentos de entramado, que en general mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los bucles de CDR (aunque ciertos residuos de entramado también pueden hacer contacto con el antígeno). Por tanto, los dominios VL y VH tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

Cuando se hace referencia a las proteínas o anticuerpos de unión (como se definen ampliamente en el presente documento), la asignación de los aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas son designadas por la posición de un aminoácido de la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para los anticuerpos, identificó una secuencia consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de residuos a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat puede extenderse a los anticuerpos no incluidos en su compendio alineando el anticuerpo pertinente con una de las secuencias consenso en Kabat haciendo referencia a aminoácidos conservados. Este método para asignar números de residuos se ha vuelto una norma en el campo e identifica fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes de diferentes anticuerpos, incluidas las variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido que esté en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo murino.

Como se utiliza en el presente documento, el término "cadena pesada" se utiliza para definir la cadena pesada de un anticuerpo IgG. En una IgG natural, intacta, la cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3. A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat *et al*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), expresamente incorporada en el presente documento como referencia. El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU IgG1 humano. Los ejemplos de las secuencias de aminoácido que contienen los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la IgG1 humana se muestran en las figuras 1A y 1B como se describe, a continuación. Las figuras 1A y 1B también muestran secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra, CH2 y CH3 de las cadenas pesadas de IgG2, IgG3 e IgG4. Las secuencias de aminoácidos de los isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 están alineadas con la secuencia de IgG1 colocando el primero y último residuos de cisteína de las regiones bisagra respectivas, que forman los enlaces S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la región bisagra de IgG2 e IgG3, no todos los residuos están numerados con el índice EU.

La "región bisagra" o "dominio bisagra" generalmente se define como alargamiento desde Glu216 hasta Pro230 de la IgG1 humana. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de la IgG1 humana se presenta en la figura 1A (los residuos de aminoácido de la figura 1A están numerados de acuerdo con el sistema Kabat). Las regiones bisagra de los otros isotipos de IgG pueden ser alineados con la secuencia de la IgG1 colocando el primer y último residuos de cisteína que forman los enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones como se

muestra en la figura 1A.

Como se utiliza en el presente documento, el término “región Fc”, “dominio Fc” o términos análogos se utilizan para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos que contiene la IgG1 humana se presenta en la figura 1B. Aunque los contornos pueden variar ligeramente, como se numeró de acuerdo con el sistema Kabat, el dominio Fc se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447 (los residuos de aminoácido de la figura 1B están numerados de acuerdo con el sistema Kabat). La figura 1B también proporciona ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc de los isotipos de IgG IgG2, IgG3 e IgG4.

La región Fc de una IgG contiene dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana por lo regular se extiende desde los aminoácidos 231 hasta el aminoácido 341 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (figura 1B). El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana por lo regular se extiende desde los aminoácidos 342 hasta 447 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (figura 1B). El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (al que también se le conoce como dominio “Cγ2”) es único en cuanto a que no se aparea estrechamente con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una IgG natural, intacta.

Como se utilizan en el presente documento los términos “proteína de unión al FCγR”, “anticuerpo contra FCγR” y “anticuerpo anti-FCγR”, se utilizan de manera indistinta y se refieren a diversas proteínas de tipo inmunoglobulina o derivadas de inmunoglobulina. Las “proteínas de unión a FCγR” se unen al receptor FCγR a través de una interacción con los dominios VL y/o VH (distinta de la unión mediada por FCγ). Los ejemplos de las proteínas de unión a FCγR incluyen anticuerpos completamente humanos, policlonales, quiméricos y humanizados (por ejemplo, que contienen 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras), fragmentos de estos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales (véase, por ejemplo, Lanzavecchia *et al*. (1987) “*The Use Of Hybrid Hybridomas To Target Human Cytotoxic T Lymphocytes*”, Eur. J. Immunol. 17: 105-111), anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, Bird *et al*. (1988) “*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*”, Science 242:423-26), proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión presentadoras de fagos), “minicuerpos” (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.837.821) y otras proteínas de unión a antígeno que contengan un dominio VL y/o VH o fragmento de éste. En un aspecto, la proteína de unión a FCγRIIIA es un “anticuerpo tetramérico” es decir, que tiene generalmente la estructura de una IgG natural y que comprende dominios variables y constantes, es decir, dos cadenas ligeras que contienen un dominio V_L y un dominio constante de cadena ligera y dos cadenas pesadas que comprenden un dominio V_H y dominios bisagra y constante de cadena pesada.

Como se utiliza en el presente documento el término “antagonistas de FCγR” y términos análogos se refieren a una proteína y sustancias no proteicas, incluidas las moléculas pequeñas que antagonizan en al menos una actividad biológica de un FcγR, por ejemplo, bloquean la señalización. Por ejemplo, las moléculas de la invención bloquean la señalización bloqueando la unión de las IgG a un FCγR.

Como se utiliza en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de los polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido alterada mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término “derivado” como se utiliza en el presente documento también se refiere a un polipéptido o proteína que ha sido modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o la proteína. Por ejemplo, pero no como limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un antígeno u otra proteína celular, etc. Un polipéptido o proteína derivada puede producirse mediante modificaciones químicas utilizando las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación. formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de polipéptido o proteína presenta una función similar o idéntica a la del polipéptido o proteína de que se derivó.

Como se utiliza en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de un derivado no proteico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma basándose en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluyendo pero sin limitarse a, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o deleción de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amino. Una molécula orgánica también puede esterificarse, alquilarse y/o fosforilarse.

Como se utiliza en el presente documento, el término “molécula de diacuerpo” se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, que comprenden cada una al menos un dominio VL y un dominio VH o fragmento de éstos, en donde ambos dominios están comprendidos dentro de una sola cadena polipeptídica. En ciertas realizaciones “moléculas de diacuerpo” incluye moléculas que comprenden un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. Dichas cadenas polipeptídicas en el complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En aspectos específicos, el término “molécula de diacuerpo” incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen un dominio VL y VH. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden estar unidas de manera

covalente a al menos otro péptido del multímero por enlaces disulfuro entre las cadenas.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se utilizan de manera indistinta para referirse a un estado en un individuo. En particular, el término “enfermedad autoinmunitaria” se utiliza de manera indistinta con el término “trastorno autoinmunitario” para referirse a un estado en un individuo caracterizado por lesión celular, tisular y/o orgánica provocada por una reacción inmunológica del individuo a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término “enfermedad inflamatoria” se utiliza de manera indistinta con el término “trastorno inflamatorio” para referirse a un estado en un individuo, caracterizado por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con inflamación. Más aún, la inflamación puede ser provocada o no por un trastorno autoinmunitario. Por tanto, algunos trastornos pueden caracterizarse como trastornos autoinmunitarios e inflamatorios.

“Cadenas polipeptídicas idénticas”, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a cadenas polipeptídicas que tengan secuencia de aminoácidos casi idéntica, por ejemplo, incluidas las cadenas que tienen una o más diferencias de aminoácidos, preferiblemente sustituciones conservadoras de aminoácidos, de modo que la actividad de las dos cadenas polipeptídicas no sea significativamente diferente.

Como se utiliza en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a una neoplasia o tumor un resultante del crecimiento no controlado, anómalo, de células. Como se utiliza en el presente documento, la palabra cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales adyacentes y se dispersa a lugares distantes. En algunas realizaciones, el cáncer se asocia con un antígeno específico de cáncer.

Como se utiliza en el presente documento, el término “agente inmunomodulador” y variaciones de este se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un huésped. En ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En algunas otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se utiliza en el presente documento, el término “epítopo” se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula no proteica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y lo más preferiblemente en un humano. Un epítopo que tenga actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que desencadena una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítopo que tenga actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que se une de manera inmunoespecífica un anticuerpo, tal como se determina mediante cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. No es necesario que los epítopos antigénicos sean inmunogénicos.

Como se utiliza en el presente documento, el término “fragmento” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “ácidos nucleicos” y “secuencias de nucleótidos” incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN y análogos de moléculas de ADN o ARN. Tales análogos pueden generarse utilizando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, incluyendo pero sin limitarse a, inosina o bases tritiladas. Tales análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden esqueletos modificados que les otorgan atributos beneficiosos para las moléculas incluyendo por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad aumentada para atravesar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios o pueden contener partes monocatenarias y bicatenarias, y pueden contener partes tricatenarias, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Como se utiliza en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o manejar un trastorno o enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o llevar al mínimo el inicio de la enfermedad, por ejemplo, retardar o llevar al mínimo la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el

tratamiento o manejo de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o combinado con otros tratamientos, que proporciona un beneficio terapéutico para el tratamiento o manejo de una enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “agente profiláctico” y “agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente(s) que puede utilizarse para la prevención de un trastorno, o la prevención de la recurrencia o propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para impedir la recurrencia o la propagación de una enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la presencia de éste en un paciente, incluyendo pero sin limitarse a, aquellos que están predispuestos a la enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo aquellos que están genéticamente predispuestos a cáncer o previamente expuestos a cancerígenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporcione un beneficio profiláctico para la prevención de una enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la invención significa aquella cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico para la prevención de la enfermedad.

Como se utilizan en el presente documento los términos, “prevenir”, “prevención” y “previniendo” se refieren a la prevención de la recurrencia o el inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un individuo como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se utilizan en el presente documento, los términos “en combinación”, “combinado con” se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso del término “en combinación” no limita el orden en que se administran los agentes profilácticos y/o terapéuticos a un individuo con un trastorno. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), de manera concomitante con, o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un individuo con un trastorno.

“Función efectora” como se utiliza en el presente documento se entiende un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor de Fc o un antígeno. Funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen aquellas que operan después de la unión de un antígeno y aquellas que operan independientes de la unión a antígeno.

“Célula efectora”, como se utiliza en el presente documento, se entiende una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media en una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, linfocitos citolíticos naturales (células NK) y pueden ser de cualquier organismo incluyendo, pero sin limitarse a, humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Como se utiliza en el presente documento, el término “se une específicamente a un complejo inmunitario” y términos análogos se refiere a moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un complejo inmunitario puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad tal como se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario no tienen reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario pueden ser identificadas, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Una “proteína de fusión estable”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína de fusión que experimenta un nivel de degradación mínimo a no detectable durante la producción y/o almacenamiento, tal como se evaluó utilizando ensayos bioquímicos y funcionales comunes conocidos por los expertos en la técnica, y puede almacenarse durante un periodo de tiempo prolongado sin pérdida de la actividad biológica, por ejemplo, la unión a FCγR.

4. Breve descripción de los dibujos

FIGS. 1 A-B SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS REGIONES CH1, BISAGRA y Fc DE IgG HUMANA

La figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra (A) y Fc (B) de la IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. (Dominio bisagra de IgG1 (ID SEC NO: 1); dominio bisagra de IgG2 (ID SEC NO: 2); dominio bisagra de IgG3 (ID SEC NO: 3); dominio bisagra de IgG4 (ID SEC NO: 4); dominio Fc de IgG1 (ID SEC NO: 5); dominio Fc

de IgG2 (ID SEC NO: 6); dominio Fc de IgG3 (ID SEC NO: 7); dominio Fc de IgG1 (ID SEC NO: 8). Los residuos de aminoácidos que se muestran en las figuras 1A y 1B se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat EU. Las secuencias isotipo se alinean con la secuencia de la IgG1 colocando el primer y último residuos de cisteína de las regiones bisagra, respectivas, lo que forma los enlaces S-S entre cadenas pesadas, en las mismas posiciones. En la figura 1B, los residuos del dominio CH2 están indicados por +, mientras que los residuos del dominio CH3 están indicados por ~.

FIG. 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS DE DIACUERPOS BIFUNCIONALES COVALENTES

Los polipéptidos de un diacuerpo bifuncional covalente consisten en un dominio VL de anticuerpo y un dominio VH de anticuerpo separados por un ligador peptídico corto. El ligador de 8 residuos de aminoácidos evita el autoensamblaje de una sola cadena polipeptídica para dar los constructos scFv, y, en cambio, las interacciones entre los dominios VL y VH de diferentes cadenas polipeptídicas predominantes. Se crearon 4 constructos (cada constructo está descrito desde el extremo amino-terminal (“n”), lado izquierdo del constructo, hasta el extremo carboxilo-terminal (“c”), lado derecho de la figura): constructo (1) (ID SEC NO: 9) formado por, n-el dominio VL Hu2B6 – ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; constructo (2) (ID SEC NO: 11) formado por n-el dominio VL Hu3G8 - ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; constructo (3) (ID SEC NO: 12) formado por n-el dominio VL Hu3G8 - ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; constructo (4) (ID SEC NO: 13) formado por n-el dominio VL Hu2B6 - ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c.

FIG. 3 ANÁLISIS DE SDS-PAGE DE LOS DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

Los diacuerpos purificados por afinidad se sometieron a análisis de SDS-PAGE (dodecilsulfato de sodio-electroforesis en gel de poliacrilamida) en condiciones reductoras (carriles 1-3) o no reductoras (carriles 4-6). Se indican los pesos moleculares aproximados del patrón (entre los carriles 3 y 4). Carriles 1 y 4, CMD h3G8; carriles 2 y 5, CMD h2B6; y carriles 3 y 6, CBD h2B6-h3G8.

FIGURAS 4A-B ANÁLISIS DE SEC DE DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

Los diacuerpos purificados por afinidad se sometieron a análisis de SEC (cromatografía de exclusión molecular). (A) Perfil de elución de patrones conocidos: IgG de longitud completa (~150 kDa), fragmento Fab de IgG (~50 kDa) y scFv (~30 kDa); (B) Perfil de elución del CMD h2b6, el CMD h3G8 y el CBD h2B6-h3G8.

FIG. 5 UNIÓN DEL CBD h2B6-h3G8 A LAS PROTEÍNAS sCD32B Y sCD16A

La unión del CBD h2B6-h3G8 a las proteínas sCD32B y sCD16A se sometió a ensayo en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Se utilizó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP (peroxidasa de rábano). Como control se utilizó el CMD h3G8, que se une a CD16A.

FIGS. 6 A-C ANÁLISIS DE BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPO A sCD16A, sCD32B Y sCD32B

La unión del diacuerpo CBD h2B6-h3G8, el CMD h2B6 y el CMD h3G8 a sCD16A, sCD32B y sCD32A (control negativo) se sometió a ensayo mediante análisis de SPR (espectroscopía de resonancia de plasmón superficial). También se sometió a ensayo como control el scFv h3G8. (A) Unión a sCD16; (B) unión a sCD32B y (C) unión a sCD32A. Se inyectaron los diacuerpos a una concentración de 100 nM, y el fragmento scFv a una concentración de 200 mM, sobre las superficies receptoras a una velocidad de flujo de 50 ml/min durante 60 s.

FIGS. 7 A-C ANÁLISIS DE BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPO A sCD16A y sCD32B

La unión del CBD h2B6-h3G8 y el CMD h2B6 y el CMD h3G8 a sCD16A y sCD32B se sometió a ensayo mediante análisis de SPR. El fragmento scFv h3G8 también se sometió a prueba como control. (A) Unión de CMD h3G8 a sCD16A; (B) unión del CBD h2B6-h3G8 a sCD16A; (C) unión del scFv h3G8 a sCD16A; (D) unión del CMD h2B6 a sCD32B; y (E) unión del CBD h2B6-h3G8 a sCD32B. Se inyectaron los diacuerpos en concentraciones de 6,25-200 nM sobre superficies receptoras a una velocidad de flujo de 70 ml/min durante 180 s.

FIG. 8 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN LOS DOMINIOS VL Y VH PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO BIESPECÍFICA COVALENTE

NH_2 y COOH representan los grupos amino-terminal y carboxilo-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el residuo de cisteína C-terminal en cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las partes ligadoras de tales cadenas. Fv

h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión a epítopo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 9 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc DE LOS DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

Representación de los constructos polipeptídicos de las moléculas de diacuerpo de la invención (cada constructo está descrito desde el extremo amino-terminal ("n"), el lado izquierdo del constructo, hasta el extremo carboxilo-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Constructo (5) (ID SEC NO: 14) formado por, n-dominio VL de Hu2B6 – un primer ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – un segundo ligador (LGGC)- y un dominio Fc C-terminal de IgG1 humana-c; constructo (6) (ID SEC NO: 15) formado por n-el dominio VL Hu3G8 - ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y el segundo ligador (LGGC)- y un dominio Fc C-terminal de IgG1 humana-c; constructo (7) (ID SEC NO: 16) compuesto por n-el dominio VL Hu2B6 – un primer ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGCFNRGEC) (ID SEC NO: 17)-c; constructo (8) (ID SEC NO: 18) formado por n-el dominio VL Hu3G8 – ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y un segundo ligador (LGGC)- y un dominio bisagra/Fc C-terminal de IgG1 humana (con sustitución de aminoácido A215V)-c.

FIG. 10 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc A sCD32B Y sCD16A

La unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A se sometió a ensayo en un ensayo ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos sometidos a ensayo se produjeron por 3 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 y pMGX674, que expresan los constructos 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX667 y pMGX676, que expresan los constructos 2 y 5, respectivamente; y cotransfección de pMGX674 y pMGX676, que expresan los constructos 5 y 6, respectivamente. Se utilizó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP.

FIG. 11 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS DOS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE COMPRENDEN CADA UNA UN DOMINIO Fc PARA FORMAR UN DIACUERPO BIVALENTE, COVALENTE

NH_2 y COOH representan el extremo amino-terminal y extremo carboxilo-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína en la segunda secuencia ligadora de cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras partes ligadoras de tales cadenas. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión a epítopo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 12 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS BISAGRA/Fc A sCD32B Y sCD16A

La unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A se sometió a ensayo en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos sometidos a ensayo se produjeron por 4 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 + pMGX674, que expresan los constructos 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX669 + pMGX678, que expresan los constructos 2 y 8, respectivamente; cotransfección de pMGX677 + pMGX674, que expresan los constructos 7 y 6, respectivamente; y cotransfección de pMGX677 + pMGX678, que expresan los constructos 7 y 8, respectivamente. Se utilizó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugada a HRP.

FIG. 13 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO TETRAMÉRICA

NH_2 y COOH representan el extremo amino-terminal y extremo carboxilo-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína en la segunda secuencia ligadora de la cadena polipeptídica, 'más pesada', que porta el dominio Fc y un residuo de cisteína en la secuencia C-terminal de la cadena polipeptídica 'más ligera' que no porta Fc. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras partes ligadoras de las cadenas más pesadas o el ligador de las cadenas más ligeras. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican el sitio de unión a epítopo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 14 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc QUE FORMAN DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

Representación de constructos polipeptídicos que forman las moléculas de diacuerpo de la invención (cada constructo está descrito desde el extremo amino-terminal ("n"), el lado izquierdo del constructo, hasta el extremo carboxilo-terminal ("c"), el lado derecho de la figura). Constructo (9) (ID SEC NO: 19) compuesto por n-un dominio

bisagra/Fc de la IgG1 humana – el dominio VL Hu3G8 – ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10))- y una secuencia LGGC C-terminal-c; constructo (10) (ID SEC NO: 20) formado por n-un dominio Fc de la IgG1 humana – el dominio VL Hu3G8 – ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 - ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10))- y una secuencia LGGC C-terminal-c; constructo (11) (ID SEC NO: 21) formado por n-el dominio VL Hu2B6 (G105C) - ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y un dominio bisagra/Fc C-terminal de IgG1 humana con sustitución de aminoácido A215V-c; constructo (12) (ID SEC NO: 22) compuesto por n-el dominio VL Hu3G8 - ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 (G44C) – y una secuencia FNRGEC C-terminal (ID SEC NO: 23)-c.

FIG. 15 A-B ANÁLISIS DE SDS-PAGE Y DE INMUNOTRANFERENCIA DE TIPO WESTERN DE LA AFINIDAD DE DIACUERPOS TETRAMÉRICOS

Los diacuerpos producidos por sistemas de expresión recombinante cotransfectados con vectores que expresan los constructos 10 y 1, los constructos 9 y 1, y los constructos 11 y 12 se sometieron a análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) y análisis de inmunotranferencia de tipo Western utilizando anticuerpo de cabra anti-H+L de IgG1 humana como sonda (B). Las proteínas del gel SDS-PAGE fueron visualizadas con tinción con Simply Blue Safestain (Invitrogen). En ambos paneles A y B, las moléculas de diacuerpo que comprenden los constructos 10 y 11, constructos 9 y 1, y los constructos 11 y 12A están en las carriles 1, 2 y 3, respectivamente.

FIG. 16 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc Y ENLACES DISULFURO ENTRE CADENAS MODIFICADOS POR INGENIERÍA A sCD32B Y sCD16A

La unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc y enlaces disulfuro manipulados por ingeniería entre las cadenas polipeptídicas 'más ligera' y 'más pesada' a sCD32B y sCD16A se sometió a ensayo en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos sometidos a ensayo se produjeron con 3 sistemas de expresión recombinante: la expresión de los constructos 1 y 10, la expresión de los constructos 1 y 9, y la expresión de los constructos 11 y 12, respectivamente. Se utilizó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con HRP. Se usó como control la unión de h3G8.

FIG. 17 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNA DE LA MOLÉCULA DE DIACUERPO Y REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN LOS DOMINIOS DE CADENA LIGERA LAMBDA Y/O BISAGRA

Representación de los constructos polipeptídicos que comprenden las moléculas de diacuerpo de la invención (cada constructo se descrube desde el extremo amino-terminal ("n"), el lado izquierdo del constructo, hasta el extremo carboxilo-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Constructo (13) (ID SEC NO: 95) compuesto por, n-dominio VL 3G8 – un primer ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de 2.4G2VH – un segundo ligador (LGGC)-sitio de reconocimiento de furina (RAKR (ID SEC NO: 93))-dominio VL de 2.4G2 – un tercer ligador (GGGSGGG (ID SEC NO: 10)-dominio VH de 3G8 – y un dominio LGGC C-terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica ID SEC NO: 95 se proporciona en la ID SEC NO: 96). Constructo (14) (ID SEC NO: 97) formado por, n-dominio VL 3G8 – un primer ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de 2.4G2VH – un segundo ligador (LGGC)-sitio de reconocimiento de furina (RAKR (ID SEC NO: 93))-FMD (proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa) dominio VL de 2.4G2-un tercer ligador (GGGSGGG (ID SEC NO: 10)-dominio VH de 3G8- y un dominio LGGC C-terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica ID SEC NO: 97 se proporciona en la ID SEC NO: 98). Constructo (15) (ID SEC NO: 99) formado por, n-dominio VL Hu2B6 – un ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8- y un dominio FNRGEC C-terminal (ID SEC NO: 23); (la secuencia de nucleótidos que codifica ID SEC NO: 99 se proporciona en la ID SEC NO: 100). Constructo (16) (ID SEC NO: 101) formado por, n-dominio VL Hu3G8 – un ligador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6- y un dominio VEPKSC C-terminal (ID SEC NO: 77); (la secuencia de nucleótidos que codifica ID SEC NO: 101 se proporciona en la ID SEC NO: 102).

FIG. 18 UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO DERIVADAS A PARTIR DE UNA MOLÉCULA PRECURSORA DE POLIPROTEÍNA A mCD32B Y sCD16A

La unión de las moléculas de diacuerpo derivadas a partir de la molécula precursora de poliproteína, constructo 13 (ID SEC NO: 95) a CD32B murino (mCD32B) y CD16A soluble (sCD16A) se sometió a ensayo en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Se utilizó mCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugada a biotina.

FIG. 19 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS CADENA LAMBDA Y/O BISAGRA A sCD32B Y sCD16A

La unión de las moléculas de diacuerpo compuestas de dominios derivados a partir del extremo C-terminal de cadena ligera lambda humana y/o el dominio bisagra de la IgG a sCD32B y sCD16A se sometió a ensayo y se comparó con el diacuerpo que comprende los constructos 1 y 2 (figura 5) en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos sometidos a ensayo se produjeron mediante el sistema de expresión recombinante que expresa los

constructos 15 y 16 (ID SEC NO: 99 e ID SEC NO: 101, respectivamente). Se utilizó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugada a HRP. Las barras con cuadros pequeños representan la combinación de los constructos 15/16, mientras que las barras con cuadros grandes representan la combinación de los constructos 1/2.

FIG. 20 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE DART 2B6/4420 UNIDO A CD32B UBICADO EN LA SUPERFICIE DE UNA CÉLULA Y UNA MOLÉCULA CONJUGADA A FLUORESCEÍNA

El diagrama muestra la flexibilidad del brazo anti-fluoresceína "adaptador universal" de DART así como la posibilidad de sustituir otras especificidades por el brazo 2B6. Se muestran las regiones V como cuadros, los ligadores GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) se muestran como líneas, el enlace disulfuro se muestra conectando las dos cadenas. Los constituyentes de una cadena se muestran en azul, mientras que el otro tiene color rosa. N, extremo amino-terminal; C, extremo carboxilo-terminal; FL, fluoresceína, VL, región variable de cadena ligera; VH, región variable de cadena pesada.

FIG. 21 (PANELES A Y B) EL DART 2B6/4420 SE UNE ESPECÍFICAMENTE A MOLÉCULAS CONJUGADAS A FLUORESCEÍNA Y PUEDE UNIRSE SIMULTÁNEAMENTE A CD32B.

(A) Se unieron 2B6/4420 o 2B6/3G8 a placas para ELISA recubiertas con proteína FITC-S. La unión y función del brazo 2B6 se detectaron por la unión de CD32B soluble, seguido por un anticuerpo específico para CD32B y un anticuerpo de detección secundario conjugado a HRP. (B) 2B6/4420 o 2B6/3G8 se unieron a placas para ELISA recubiertas con HuIgG o FITC-HuIgG (conjugadas a fluoresceína). Se detectó la unión mediante la involucración con un suero policlonal específico para Fv 2B6 seguido por un anticuerpo secundario conjugado a HRP.

FIG. 22 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE CÉLULAS B PURIFICADAS UTILIZANDO ANTICUERPOS ANTI-CD79B HUMANOS.

Las células B purificadas se activaron utilizando concentraciones crecientes de los anticuerpos anti-CD79b humano conjugados a FITC, CB3.1-FITC (A) o CB3.2-FITC (B) y 50 μg/ml del fragmento $F(ab')_2$ de Fc de IgG GAM específico (eje x). Las células B se activaron en presencia de PBS (barras blancas) o 5 μg/ml de αFITCαCD32BDART (barras negras) o αCD16αCD32BDART (barras grises). Se realizaron las reacciones por triplicado y se calcularon las desviaciones estándar.

FIG. 23 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE CÉLULAS B PURIFICADAS

Las células B purificadas derivadas de un segundo donante sano se activaron como se describe en la figura 22, Panel B. El índice de proliferación se midió en las células activadas en presencia del anticuerpo anti-CD79b conjugado a FITC, CB3.2-FITC (A) y se comparó con el índice de proliferación de células activadas en presencia del anticuerpo CB3.2 no marcado (B).

FIG. 24 (Paneles superior e inferior) DEPLECIÓN DE CÉLULAS B MURINAS *IN VIVO* EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B UTILIZANDO MGD261

A ratones C57B1/6 mCD32-/-hCD16 A+, C57B1/6 mCD32-/- hCD32B+ y ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ de la colonia de reproducción MacroGenics se les inyectó por vía IV (intravenosa) en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió la sangre en los días -19 (antes de la extracción de sangre), 4, 11, 18, 25 y 32 para el análisis de FACS (citometría de flujo). Tres veces a la semana se registró la salud y la actividad de los animales. Panel superior: h2B6-3G8 y Acm WNV; Panel inferior: h2B6-3G8 de ratones -hCD16A o -hCD32B y Acm WNV de ratones -hCD16A o - hCD32B.

FIG. 25 DEPLECIÓN DE CÉLULAS B MURINAS *IN VIVO* EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B UTILIZANDO DB 2.4G2-3G8

A ratones C57B1/6 mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+ de la colonia de reproducción MacroGenics se les inyectó por vía intraperitoneal (IP) en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 el DB 2.4G2-3G8 (75 μg/ratón), o PBS (solución salina tamponada con fosfato). Se recogieron muestras de sangre en los días -10 (antes de la extracción de sangre), 4, 11 y 18 para el análisis de FACS (citometría de flujo). Tres veces a la semana se registró la salud y la actividad de los animales.

FIG. 26 DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TUMORAL DE MGD261 UTILIZANDO UN MODELO INTRAVENOSO (IV) DE LA LÍNEA DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS RAJI.

A ratones C57B1/6 mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- de doce a veinte semanas de la colonia de reproducción MacroGenics se les inyectó por vía intravenosa en el día 0 $5x10^6$ células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también fueron tratados por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2,5 μg de MGD261 o con PBS

(control negativo). Después se observó a los ratones a diario y se documentó el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que presentaron parálisis de las patas posteriores fueron sacrificados.

FIG. 27 EXPRESIÓN DE DART EN HUÉSPED NO MAMÍFERO

Se transformaron células BL21DE3 (Novagen) con el plásmido pET25b(+) *T7-lac+* 3G8/3G8 y se utilizó una colonia resistente a ampicilina para sembrar un caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó las 0,5 unidades de DO600, se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión. El cultivo se hizo crecer a 30ºC durante 2 horas y se recogió medio libre de células.

FIG. 28 ELISA DE DART

Se llevaron a cabo ELISA de unión a DART h3G8-h3G8 utilizando placas Maxisorp de 96 pocillos. Después de la reacción, se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1%. Se leyó la DO450 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura utilizando el software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 29 MUERTE DE CÉLULAS B HUMANAS INDUCIDA POR DART

Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas durante la noche con las moléculas indicadas. Se sometió a ensayo la apoptosis mediante análisis de citometría de flujo como el porcentaje de la población PI^+anexina-V^+ de células B (células CD20+) en la población total no regulada por FSC/SSC (detección de dispersión frontal/detección de dispersión lateral).

FIG. 30 CONSTRUCTOS DE DART 8B5-CB3.1

Se produjeron múltiples constructos de DART 8B5-CB3.1 para ilustrar la presente invención. Los constructos 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, plásmidos de expresión codificados fueron cotransfectados en células HEK-293 para expresar el DART 8B5-CB3.1 con o sin etiqueta anti-bandera utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego utilizando la columna por afinidad de CD32B.

FIG. 31 DART 8B5-CB3.1 - ELISA

Se realizaron ELISA de competencia de DART 8B5-CB3.1/ch8B5 utilizando placas Maxisorp de 96 pocillos. Después de la reacción, se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrollo con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1%. Se leyó la DO450 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura utilizando el software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 32 DEMOSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE DART TETRAVALENTE

Se ilustra la estructura general de una especie de DART producida mediante el ensamblaje de cuatro cadenas polipeptídicas. Los cuatro dominios de unión a antígeno del DART de tipo Ig se muestran como elipses rayadas y de color gris oscuro.

FIG. 33 DART TETRAVALENTE DE TIPO Ig

Se proporciona un esquema de los sitios de unión a epítopo de un DART tetravalente de tipo Ig.

FIG. 34 ELISA DE UNIÓN DE mCD32-hCD16A

Se proporcionan los resultados de ELISA que demuestran que las especies de DART tetravalentes de tipo Ig del ejemplo 6.10 se unen a antígeno con mayor afinidad que el anticuerpo de control (Acm ch-mCD32) u otras especies de DART.

FIG. 35 DEMOSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS MOLÉCULAS DE DART de tipo Ig

Se proporciona un esquema de las moléculas DE DART de tipo Ig. Se indica la especificidad mediante regiones sombreadas, con un patrón o de color blanco, se muestran las regiones constantes en negro y los enlaces disulfuro se indican mediante líneas negras punteadas. Los extremos N-terminales de todas las cadenas de proteína están orientados hacia la parte superior de la figura, mientras que los extremos C-terminales de todas las cadenas de proteína están orientados hacia la parte inferior de la figura. Las ilustraciones A-E son biespecíficas y las ilustraciones F-J son triespecíficas. Las ilustraciones A y E son tetravalentes. Las ilustraciones B, C, F, I y J son hexavalentes. Las ilustraciones D, G y H son octavalentes. Para ver los detalles de las descripciones de cada uno de

los dominios consulte las figuras 1, 2, 9, 14 y 17 y la sección 3.1.

FIG. 36 CAPACIDAD DE UNIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO HU2B6 4.5-HU3G8 5.1

La figura 36 muestra la capacidad del diacuerpo biespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 (cuadrados) para unirse a CD32b y CD16a respecto a los diacuerpos Hu2B6 4.5 o Hu3G8 5.1 (triángulos).

FIG. 37 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS DERIVADOS DE DART CON OVILLO E Y OVILLO K

La figura 37 ilustra la conformación general de los derivados de DART con ovillo E (E-coil) y ovillo K (K-coil).

FIG. 38 DISPOSICIÓN HELICOIDAL DE LOS SEPARADORES DE OVILLO E Y OVILLO K

La figura 38 muestra la disposición helicoidal de la secuencia de “ovillo E” preferida $(EVAALEK)_4$ (ID SEC NO: 299) y la secuencia de “ovillo K” preferida $(KVAALKE)_4$ (ID SEC NO: 300).

FIG. 39 DERIVADOS DE DART QUE CONTIENEN Fc CON OVILLO E Y OVILLO K

La figura 39 ilustra las diferentes especies de derivados de DART que contienen Fc con ovillo E y ovillo K que pueden formarse mediante intercambio de cadenas.

FIG. 40 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN LOS DERIVADOS CON OVILLO E Y/O OVILLO K Y/O DERIVADOS QUE CONTIENEN FC CON OVILLO E Y/O OVILLO K DE LOS DART h2B6YAhCB3

La figura 40 muestra los resultados de la cromatografía de exclusión molecular en los derivados con ovillo E y/o ovillo K y los derivados que contienen Fc con ovillo E y/o ovillo K de los DART h2B6YAhCB3. Se analizaron cuatro especies de tales moléculas; todas tenían un ovillo E y un ovillo K: EK (sin región Fc), 2,1 mg; EFc/K (Fc unido a ovillo E), 2,7 mg; E/KFc (Fc unido a ovillo K), 1,8 mg; EFc/KFc (Fc unido a ovillo K y ovillo E del mismo DART), 2,0 mg.

FIG. 41 ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DIMÉRICAS PRODUCIDAS

La figura 41 muestra la posible estructura de la molécula dimérica producida identificada en el cromatograma de exclusión molecular de la figura 40.

FIG. 42 ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS DE LOS DERIVADOS CON OVILLO E Y/O OVILLO K Y LOS DERIVADOS QUE CONTIENEN FC CON OVILLO E Y/O OVILLO K DE LOS DART h2B6YAhCB3

La figura 42 muestra los resultados del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones derivadas a partir de la cromatografía de exclusión molecular (figura 40) de los derivados con ovillo E y/o ovillo K y los derivados que contienen Fc con ovillo E y/o ovillo K de los DART h2B6YAhCB3. Carriles flanqueantes: controles de marcadores moleculares; carril 1: EK (sin región Fc); carril 2: EFc/K, fracción de agregado; carril 3: EFc/K, fracción de monómero; carril 4: E/KFc, fracción de agregado; carril 5: E/KFc, fracción de monómero; carril 6: EFc/KFc, fracción de agregado; carril 7: EFc/KFc, fracción de dímero; carril 8: EFc/KFc, fracción de monómero.

FIG. 43 ANÁLISIS DE ELISA DE LA UNIÓN BIESPECÍFICA

La figura 43 muestra el resultado de un ELISA de unión biespecífica que compara los derivados de DART h2B6YAhCB3 que contienen Fc con ovillo E/ovillo K (EFc/K o E/KFc), el DART h2B6YAhCB3, el control y un derivado de DART EFc/KFc h2B6YAhCB3.

FIG. 44 CAPACIDAD DE LOS DERIVADOS CON OVILLO E Y/O OVILLO K Y LOS DERIVADOS QUE CONTIENEN FC CON OVILLO E Y/O OVILLO K DE LOS DART h2B6YAhCB3 PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T

La figura 44 muestra la capacidad de los derivados con ovillo E y/o ovillo K y los derivados que contienen Fc con ovillo E y/o ovillo K de los DART h2B6YAhCB3 para inhibir la proliferación de células T.

FIG. 45 DART hCD16-hCD32B ABD

La figura 45 muestra una representación esquemática de una molécula de anticuerpo recombinante, DART hCD16-hCD32B ABD compuesto por el dominio ABD3 de la proteína G estreptocócica fusionada a un DART biespecífico recombinante que es inmunorreactivo con los antígenos hCD16 y hCD32B.

FIGS. 46A-46J AFINIDAD DE UNIÓN DE DART hCD16-hCD32B ABD

Se recubrieron placas de ELISA con antígeno CD16 (figura 46A) o albúmina sérica humana (figura 46B) a una concentración de 2 µg/ml. Se unieron concentraciones variables de DART hCD16-hCD32B ABD (■) y el control DART hCD16-hCD32B (○) comenzando con 2 µg/ml. El antígeno sCD32B biotinilado se añadió a la placa seguido por estreptavidina conjugada con HRP para su detección. La figura 46C muestra que la molécula de ABD-DART fue capaz de unirse simultáneamente a CD32B, CD16A y HSA. Las figuras 46D-46I demuestran que el DART hCD16-hCD32B ABD y su derivado fusionado ABD presentan unión equivalente a CD32B soluble (sCD32B) y a CD16A (158F) soluble (sCD16A). La figura 46J demuestra que la fusión DART ABD retuvo la unión biespecífica a su DART parental, y demostró unión a sCD16A y CD32B que no se vio afectada por la presencia de albúmina sérica humana (HSA).

FIGS. 47A/47B CITOTOXICIDAD DE LAS PROTEÍNAS DART

La figura 47A demuestra la citotoxicidad mediada por PBMC de las proteínas DART. Se realizaron ensayos ADCC utilizando líneas de células B humanas, Daudi como células diana incubadas con PBMC como células efectoras. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado a una razón de efector con respecto a diana de 20:1 y una titulación de los anticuerpos: DART hCD16A-hCD32B (•) y DART hCD16A-hCD32B ABD (■). La citotoxicidad mediada por células fue medida por el ensayo de la liberación de LDH. La curva inferior a 10º es el DART hCD16A-hCD32B ABD (■). La figura 47B demuestra que el DART CD16xCD32B se une a las células efectoras que expresan CD16B y con ello recluta tales células para aniquilar (mediante aniquilación redirigida) células que expresen CD32B.

FIG. 48 PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS MEJORADAS DE DART hCD16-hCD32B ABD EN RATONES C57B1/6

A ratones (n=3) se les inyectó una sola inyección intravenosa de (A) DART hCD16-hCD32B ABD (•) y (B) DART hCD16-hCD32B (▲) a 5mg/kg. Se recogieron muestras del suero de ratones en diferentes puntos temporales y se cuantificaron las concentraciones de proteína en suero mediante ELISA. Se realizaron los cálculos farmacocinéticos utilizando WinNonlin Professional 5.1.

FIGS. 49A-49C ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VIVO DEL ABD-DART

Las figuras 49A-49C demuestran que el DART hCD16-hCD32B ABD retuvo y mostró actividad biológica, *in vivo*, después de la administración a ratones. Se halló que una sola dosis del ABD-DART o su DART parental en ratones Tg (mCD16-/-hCD16A+32B+) podía disminuir selectivamente las concentraciones de células B (figura 49A) sin afectar a las concentraciones de células T (figura 49B) o de células PM (figura 49C).

FIGS. 50A-50E ACTIVIDAD DE DART HER2 x TCRb EN UN PANEL DE LÍNEAS DE CÉLULAS DE BAJA EXPRESIÓN DE HER2

Se sometieron a prueba moléculas de DART con dominios de unión a Her2 y al receptor de células T (TCR) para determinar su capacidad para mediar en la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de vejiga que habían sido caracterizadas anteriormente con bajos niveles de expresión de HER2 (y de este modo no respondiendo al tratamiento con anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®). Las líneas celulares de cáncer de mama sometidas a prueba son ZR75-1 (HER2 2+) (figura 50A), MCF-7 (HER2 1+) (figura 50B) y MDA-MB468 (negativas para HER2) (figura 50C). Las líneas celulares que no son de cáncer de mama sometidas a prueba son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (figura 50D) y SW780 (línea celular de cáncer de vejiga) (figura 50E).

FIGS. 51A-51B PURIFICACIÓN DE LOS POLIPÉPTIDOS KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (ID SEC NO: 313) - OVILLO E Y 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (ID SEC NO: 314)

Las figuras 51A-51B muestran la purificación de los polipéptidos KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (ID SEC NO: 313) - ovillo E y 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (ID SEC NO: 314).

FIG. 52 ESPECIFICIDAD DE UNIÓN DE DART KYK2-4420 VF

La figura 52 muestra la especificidad de unión de DART KYK2-4420 VF.

FIG. 53 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pPAL7 K COIL-ABD

La figura 53 muestra una descripción esquemática del constructo del plásmido pPAL7 ovillo K-ABD.

FIG. 54 ANÁLISIS DE INMUNOTRANFERENCIA DE TIPO WESTERN DE LA PROTEÍNA OVILLO K ABD PURIFICADA MEDIANTE LA RESINA DE PURIFICACIÓN PROFINITY EXACT™

La figura 54 muestra un análisis de inmunotranferencia de tipo Western de la proteína ovillo K ABD purificada

mediante la resina de purificación PROFINITY EXACT™ (escala pequeña de cultivo de 10 ml). Los carriles 1 y 5: lisados en bruto; carriles 2 y 6: flujo pasante, carriles 3, 4, 8 y 9: proteína purificada; carril 7: marcador. Anticuerpo primario: anticuerpo anti-EK policlonal de conejo; anticuerpo secundario: anti-conejo-HRP.

FIG. 55 ANÁLISIS DE SDS-PAGE DE LA PROTEÍNA OVILLO K ABD PURIFICADA MEDIANTE LA RESINA DE PURIFICACIÓN PROFINITY EXACT™

La figura 55 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE en las fracciones eluidas de la resina para purificación PROFINITY EXACT™. L: lisado de *E. coli* en bruto; FT: flujo pasante; W: lavado; M: Marcador.

FIGS. 56A-56C UNIÓN DE DART KYK2 4420 EK ABD MEDIANTE ELISA DE DOBLE AFINIDAD

Las figuras 56A-56C muestran los resultados de ELISA que demuestran los complejos DART KYK2-4420 VF con la molécula ovillo K-ABD para formar un DART ovillo E - ovillo K ABD con propiedades mejoradas. Figura 56A: DART capturados con Fc NKG2D y detectados con el anticuerpo anti-EK monoclonal biotinilado. Figura 56B: DART capturados con el anticuerpo anti-EK monoclonal y detectados con albúmina humana-HRP. Figura 56C: DART capturados con Fc NKG2D y detectados con el anticuerpo anti-FITC biotinilado. Los resultados de ELISA muestran que todos los dominios del complejo pueden unirse a sus ligandos respectivos.

5. Descripción de las realizaciones preferidas

Cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo contiene un dominio VL y un dominio VH, que se unen de manera covalente de modo que se impida que los dominios se autoensamblen. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas producirá dos apareamientos VL-VH formando dos sitios de unión a epítopo, es decir, una molécula bivalente. Ni el dominio VH ni el VL están restringidos a alguna posición dentro de la cadena polipeptídica, es decir, restringidos al extremo amino (N)-terminal o al extremo carboxilo (C)-terminal, ni los dominios están restringidos a sus posiciones relativas entre sí, es decir, el dominio VL puede ser N-terminal respecto al dominio VH y viceversa. La única restricción es que una cadena polipeptídica complementaria esté disponible para formar el diacuerpo funcional. Cuando los dominios VL y VH se derivan del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas. Por ejemplo, cuando los dominios de unión se derivan de un anticuerpo específico para el epítopo A (es decir, el dominio de unión se forma a partir de una interacción VL_A-VH_A), cada polipéptido comprenderá un VH_A y un VL_A. La homodimerización de dos cadenas polipeptídicas de anticuerpo dará como resultado la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_A, dando como resultado un anticuerpo monoespecífico bivalente. Cuando los dominios VL y VH se derivan de anticuerpos específicos para diferentes antígenos, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico, una cadena polipeptídica comprenderá un dominio VL_A y un VL_B; la homodimerización de tal cadena dará como resultado la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_B, de no unión o de unión no predecible. Por el contrario, cuando dos cadenas polipeptídicas diferentes tienen libertad para interactuar, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante, una que contiene un dominio VL_A y uno VH_B y la otra que contiene un VL_B y un VH_A, se formaran dos sitios de unión distintos: VL_A-VH_A y VL_B-VH_B. Para todos los pares de cadenas polipeptídicas de diacuerpos, la posibilidad de desalineamiento o la ausencia de unión de las dos cadenas es una posibilidad, es decir, la interacción de los dominios VL-VL o VH-VH; sin embargo, la purificación de los diacuerpos funcionales se maneja fácilmente basándose en la inmunoespecificidad del sitio de unión adecuadamente dimerizado utilizando cualquier método basado en afinidad conocido en la técnica o ejemplificado en el presente documento, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

En otras realizaciones, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio Fc. Los dominios Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo preferiblemente se dimerizan, dando origen a la formación de una molécula de diacuerpo que presenta propiedades de tipo inmunoglobulina, por ejemplo interacciones Fc-FCγR. Los diacuerpos que comprende Fc pueden ser dímeros, por ejemplo, compuestos por dos cadenas polipeptídicas, que comprenden cada una un dominio VH, un dominio VL y un dominio Fc. La dimerización de tales cadenas polipeptídicas da origen a un diacuerpo bivalente que comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la del anticuerpo bivalente no modificado (figura 11). Estas moléculas de diacuerpo presentarán fenotipos alterados respecto a la inmunoglobulina de tipo natural, por ejemplo, semivida en suero, propiedades de unión alteradas, etc. En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo que contienen dominios Fc pueden ser tetrámeros. Tales tetrámeros comprenden dos cadenas polipeptídicas 'más pesadas', es decir, una cadena polipeptídica que contiene un dominio VL, uno VH y uno Fc, y dos cadenas polipeptídicas 'más ligeras', es decir, cadena polipeptídica que comprende un dominio VL y uno VH. Las cadenas más ligeras y más pesadas interactúan para formar un monómero, y tales monómeros interactúan a través de sus dominios Fc no apareados para formar una molécula de tipo Ig. Tal diacuerpo de tipo Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico.

Los al menos dos sitios de unión de la molécula de diacuerpo pueden reconocer los mismos epítopos o diferentes. Epítopos diferentes pueden ser del mismo antígeno o epítopos de diferentes antígenos. En una realización, los epítopos son de diferentes células. En otra realización, los epítopos son antígenos de superficie celular en la misma célula o virus. Los sitios de unión a los epítopos pueden reconocer cualquier antígeno frente al que se puede

generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunitarios, proteínas virales, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, como puede ser célula B o célula T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (célula NK) o una célula dendrítica.

Cada dominio de la cadena polipeptídica del diacuerpo, es decir, el dominio VL, VH y FC puede estar separado por un ligador peptídico. El ligador peptídico puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 aminoácidos. En ciertas realizaciones, la secuencia ligadora de aminoácidos es GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) codificada por la secuencia de ácido nucleico (ID SEC NO: 74).

En ciertas realizaciones, cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo se manipula por ingeniería para que comprenda al menos un residuo de cisteína que interaccionará con un homólogo en al menos un residuo de cisteína en una segunda cadena polipeptídica de la invención para formar un enlace disulfuro entre cadenas. Tales enlaces disulfuro entre cadenas servirá para estabilizar la molécula de diacuerpo, mejorando la expresión y recuperación de los sistemas recombinantes, dando como resultado una formulación estable y constante así como la mejora de la estabilidad del producto aislado y/o purificado *in vivo*. Dicho al menos un residuo de cisteína puede introducirse como un solo aminoácido o como parte de una secuencia de aminoácidos más grande, por ejemplo, el dominio bisagra, en cualquier parte de la cadena polipeptídica. En una realización específica, dicho al menos un residuo de cisteína se manipula por ingeniería para que se encuentre en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, dicho al menos un residuo de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGC. En una realización específica, el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LGGC. En otra realización, dicho al menos un residuo de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio bisagra, por ejemplo, la ID SEC NO: 1 o ID SEC NO: 4. En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio bisagra de IgG, por ejemplo, ID SEC NO: 1. En otra realización, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (ID SEC NO: 77), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 78). En otras realizaciones, dicho al menos un residuo de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (ID SEC NO: 17), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 76). En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (ID SEC NO: 17), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 76). En todavía otras realizaciones, dicho al menos un residuo de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos FNRGEC (ID SEC NO: 23), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 75). En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (ID SEC NO: 23), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 75).

En ciertas realizaciones, la molécula de diacuerpo contiene al menos dos cadenas polipeptídicas, cada una de las que comprende la secuencia de aminoácidos LGGC y están unidas de manera covalente por un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de dichas secuencias LGGC. En otra realización específica, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, una de las que comprende la secuencia FNRGEC (ID SEC NO: 23), mientras que la otra comprende un dominio bisagra (que contiene al menos un residuo de cisteína), en donde dichas al menos dos cadenas polipeptídicas están unidas de manera covalente por un enlace disulfuro entre el residuo de cisteína de FNRGEC (ID SEC NO: 23) y un residuo de cisteína en el dominio bisagra. En aspectos particulares, el residuo de cisteína responsable del enlace disulfuro ubicado en el dominio bisagra es Cys-128 (tal como se numera de acuerdo con el sistema Kabat EU; ubicado en el dominio bisagra de una cadena pesada de IgG intacta, no modificada) y el residuo de cisteína homólogo en la ID SEC NO: 23 es Cys-214 (tal como se numera de acuerdo con el sistema Kabat EU; ubicado en el extremo C-terminal de una cadena ligera de IgG intacta, no modificada) (Elkabetz *et al*. (2005) "*Cysteines In CHI Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains*", J. Biol. Chem. 280: 14402-14412; que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad). En todavía otras realizaciones, el al menos un residuo de cisteína se manipula por ingeniería para que se encuentre en el extremo N-terminal de la cadena de aminoácidos. En todavía otras realizaciones, el al menos un residuo de cisteína se manipula por ingeniería para que se encuentre en la parte ligadora de la cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo. En otras realizaciones, el dominio VH o VL se manipula por ingeniería para que comprenda al menos una modificación de aminoácidos respecto al dominio VH o VL parental de modo que la modificación de aminoácidos comprenda una sustitución de un aminoácido parental por cisteína.

La invención abarcar moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc o parte de este (por ejemplo, un dominio CH2 o dominio CH3). El dominio Fc o parte de éste puede derivarse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo, pero sin limitarse a, IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En las realizaciones preferidas, el dominio Fc (o parte de éste) se deriva de IgG. En realizaciones específicas, el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de éstos. En una realización, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, dominio Fc que comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 seleccionados de manera independiente a partir de cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir, un dominio Fc que comprende el dominio CH2 derivado de IgG y el dominio CH3

derivado de IgE, o el dominio CH2 derivado de IgG1 y el dominio CH3 derivado de IgG2, etc.). Tal dominio Fc puede manipularse por ingeniería para dar una cadena polipeptídica que comprenda una molécula de diacuerpo de la invención en cualquier posición respecto a otros dominios o partes de dicha cadena polipeptídica (por ejemplo, el dominio Fc o parte de éste, puede ser C-terminal para ambos dominios VL y VH del polipéptido de la cadena; puede ser N-terminal para los dominios VL y VH; o puede ser N-terminal para un dominio y C-terminal para el otro (es decir, entre dos dominios de la cadena polipeptídica)).

La presente invención también abarca moléculas que comprenden un dominio bisagra. El dominio bisagra puede derivarse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina como puede ser IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En realizaciones preferidas, el dominio bisagra se deriva de IgG, en donde el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de éstos. Tal dominio bisagra puede manipularse por ingeniería para dar una cadena polipeptídica que comprenda la molécula de diacuerpo junto con un dominio Fc de modo que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio bisagra-Fc. En ciertas realizaciones, el dominio bisagra y Fc se seleccionan independientemente de cualquier isotipo de inmunoglobulina conocido en la técnica o ejemplificado en el presente documento. En otras realizaciones, el dominio bisagra y Fc están separados por al menos otro dominio de la cadena polipeptídica, por ejemplo, el dominio VL. El dominio bisagra, o como opción, el dominio bisagra-Fc, pueden manipularse por ingeniería para dar un polipéptido de la invención en cualquier posición respecto a otros dominios o partes de la cadena polipeptídica. En ciertas realizaciones, una cadena polipeptídica de la invención comprende un dominio bisagra, dominio bisagra que está al menos en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica no comprende un dominio Fc. En todavía otras realizaciones, una cadena polipeptídica de la invención comprende un dominio bisagra-Fc, dominio bisagra-Fc que está en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. En otras realizaciones, una cadena polipeptídica de la invención comprende un dominio bisagra-Fc, dominio bisagra-Fc que está en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica.

Como se describe en lo anterior, la invención abarca multímeros de las cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de las cadenas polipeptídicas un dominio VH y VL. En ciertos aspectos, las cadenas polipeptídicas de los multímeros además contienen un dominio Fc. La dimerización de los dominios Fc da origen a la formación de una molécula de diacuerpo que presenta funcionalidad tipo inmunoglobulina, es decir, función mediada por Fc (por ejemplo, la interacción Fc-FCγR, unión del complemento, etc.). En ciertas realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen la misma especificidad, y la molécula de diacuerpo es bivalente y monoespecífica. En otras realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen diferente especificidad y el diacuerpo es bivalente y biespecífico.

En todavía otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo de la invención abarcan tetrámeros de las cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de las cadenas polipeptídica un dominio VH y VL. En ciertas realizaciones, dos cadenas polipeptídicas del tetrámero además comprenden un dominio Fc. Por tanto, el tetrámero está compuesto por dos cadenas polipeptídicas 'más pesadas', que comprenden cada una un dominio VL, VH y Fc, y dos cadenas polipeptídicas 'más ligeras', que comprenden un dominio VL y VH. La interacción de una cadena más pesada y una más ligera para dar un monómero bivalente acoplado con la dimerización de dichos monómeros a través de los dominios Fc de las cadenas más pesadas dará origen a la formación de una molécula de tipo inmunoglobulina tetravalente (ejemplificada en el ejemplo 6.2 y el ejemplo 6.3). En ciertos aspectos, los monómeros son los mismos y la molécula de diacuerpo tetravalente es monoespecífica o biespecífica. En otros aspectos, los monómeros son diferentes y la molécula tetravalente es biespecífica o tetraespecífica.

La formación de una molécula de diacuerpo tetraespecífica como se describió anteriormente requiere la interacción de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes. Es difícil lograr tales interacciones de manera eficiente en un solo sistema de producción recombinante celular, debido a las múltiples variantes de los apareamientos erróneos potenciales de las cadenas. Una solución para aumentar la probabilidad de apareamientos erróneos es manipular por ingeniería mutaciones de tipo "botones en ojales" en los pares de cadenas polipeptídicas deseadas. Tales mutaciones favorecen la heterodimerización sobre la homodimerización. Por ejemplo, con respecto a las interacciones Fc-Fc, puede introducirse una sustitución de aminoácidos (preferiblemente una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma un 'botón', por ejemplo, triptófano) en el dominio CH2 o CH3 para que una interferencia estérica impida la interacción con un dominio igualmente mutado y obligue al dominio mutado a aparearse con un dominio en el que se haya manipulado por ingeniería una mutación complementaria o de alojamiento, es decir, el 'ojal' (por ejemplo, una sustitución con glicina). Tales series de mutaciones pueden manipularse por ingeniería en cualquier par de polipéptidos que comprenden la molécula de diacuerpo, y además, manipularse en cualquier parte de las cadenas polipeptídicas de tal par. Los métodos de manipulación por ingeniería de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto a la manipulación por ingeniería de moléculas de tipo inmunoglobulina, y están abarcados en el presente documento (véase, por ejemplo, Ridgway *et al*. (1996) "'*Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization*", Protein Engr. 9:617-621, Atwell *et al*. (1997) "*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library*", J. Mol. Biol. 270: 26-35, y Xie *et al*. (2005) "*A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis*", J. Immunol. Methods 296:95-101; cada una de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad).

La invención también abarca moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc variantes o bisagra-Fc variantes (o partes de estos), dominio Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustitución, inserción, deleción) respecto a un dominio Fc de tipo natural o dominio bisagra-Fc comparable (o parte de éstos). Las moléculas que comprenden dominios Fc o bisagra-Fc variantes (o partes de estos) (por ejemplo, anticuerpos) normalmente tienen fenotipos alterados respecto a las moléculas que contienen dominios Fc o dominios bisagra-Fc de tipo natural o partes de estos. El fenotipo variante se puede expresar como semivida en suero alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o función efectora alterada tal como se determina en un ensayo dependiente de células NK o dependiente de macrófagos. Se dan a conocer variantes del dominio Fc identificadas como que alteran la función efectora en la solicitud internacional WO 04/063351, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, las solicitudes provisionales estadounidenses 60/626.510, presentada el 10 de noviembre de 2004, 60/636.663, presentada el 15 de diciembre de 2004 y 60/781.564, presentada el 10 de marzo de 2006, y las solicitudes de patente estadounidense 11/271.140, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787, presentada el 15 de diciembre de 2005, las solicitudes concurrentes de los inventores, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

Los diacuerpos biespecíficos de la invención pueden unir al mismo tiempo dos epítopos distintos e independientes. En ciertas realizaciones, los epítopos son del mismo antígeno. En otras realizaciones, los epítopos son de antígenos diferentes. En realizaciones preferidas, al menos un sitio de unión a epítopo es específico para un determinante expresado en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, CD3, CD16, CD32, CD64, etc.) que se expresan en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (células NK) u otras células mononucleares. En una realización, la molécula de diacuerpo se une al determinante de células efectoras y también activa dicha célula efectora. En este sentido, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden presentar funcionalidad de tipo Ig independientemente de si estas además contienen un dominio Fc (por ejemplo, como se determina en cualquier ensayo de la función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en el presente documento (por ejemplo, el ensayo ADCC). En ciertas realizaciones, el diacuerpo biespecífico de la invención se une tanto a un antígeno de cáncer en una célula tumoral como a un determinante de células efectoras mientras activa dicha célula. En realizaciones alternativas, el diacuerpo o molécula de diacuerpo biespecíficos de la invención puede inhibir la activación de una célula diana, por ejemplo, efectora, uniendo al mismo tiempo y así ligando, un receptor activador e inhibidor en la misma célula (por ejemplo, une CD32A y CD32B, BCR y CD32B, o IgERI y CD32B) como se describió anteriormente (véase, la sección de Antecedentes). En otro aspecto de esta realización, el diacuerpo biespecífico puede presentar propiedades antivirales uniendo simultáneamente dos epítopos neutralizantes en un virus (por ejemplo, epítopos de VRS; epítopos de WNV como puede ser E16 y E53).

En ciertas realizaciones, las moléculas de diacuerpo biespecíficas de la invención ofrecen oportunidades únicas para seleccionar como diana tipos de células específicas. Por ejemplo, el diacuerpo o la molécula de diacuerpo biespecíficos puede manipularse por ingeniería para comprender una combinación de sitios de unión a epítopo que reconozcan una serie de antígenos únicos frente a un tipo de célula o tejido diana. Además, cuando cualquiera o ambos antígenos individuales esté(n) normalmente separados en otros tipos de tejido y/o célula, es posible utilizar dominios de unión de afinidad baja con el fin de construir el diacuerpo o la molécula de diacuerpo. Tales dominios de unión de baja afinidad serán incapaces de unirse al epítopo o antígeno con suficiente avidez para propósitos terapéuticos. No obstante, cuando están presentes epítopos o antígenos en una sola célula o tejido diana, la avidez del diacuerpo o la molécula de diacuerpo para la célula o tejido, respecto a la célula o tejido que expresa solo uno de los antígenos, aumentará de modo que la célula o tejido puede seleccionarse como diana efectivamente por la invención. Tal molécula biespecífica puede presentar unión mejorada a uno o ambos de sus antígenos diana en células que expresen tales antígenos respecto a un diacuerpo monoespecífico o un anticuerpo con una especificidad por solo uno de los antígenos.

Preferiblemente, las propiedades de unión de los diacuerpos de la invención se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar la actividad de unión y/o una o más funciones de células efectoras del mediador FCγR (mediadas a través de interacciones Fc-FCγR o mediante la unión inmunoespecífica de una molécula de diacuerpo a un FCγR) (véanse las secciones 5.4.2 y 5.4.3). Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas, por ejemplo, diacuerpos, de la invención para un FCγR se pueden determinar utilizando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones dominio de unión-antígeno o Fc-FCγR, es decir, la unión específica de un antígeno a un dominio de unión o la unión específica de una región Fc a un FCγR, respectivamente, incluido, pero sin limitarse a, ensayos ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación (véase la sección 5.4.2). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (como pueden ser aquellos descritos y dados a conocer en el presente documento) como aquellos ensayos basados en reacciones *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no presenten el fenotipo deseado en los ensayos *in vitro* pero que presenten el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se manipulan por ingeniería para que comprendan un patrón de glicosilación alterado o una glicoforma alterada respecto a la parte comparable de la molécula molde. Las glicoformas manipuladas por ingeniería pueden ser útiles para diversos propósitos incluyendo pero sin limitarse a, mejorar la función efectora. Las glicoformas manipuladas por ingeniería pueden ser generadas mediante cualquier

método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo utilizando cepas manipuladas por ingeniería o de expresión variable, mediante coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo, DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), expresando un diacuerpo de la invención en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o modificando el/los hidrato(s) de carbono después de que el diacuerpo haya sido expresado y purificado. Los métodos para generar glicoformas manipuladas por ingeniería son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, las descritas en los documentos Umana *et al*. (1999) "*Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgGl With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity*", Nat. Biotechnol 17: 176-180; Davies *et al*. (2001) "*Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII*", Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields *et al*. (2002) "*Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fc gamma RIII And Antidoby-Dependent Cellular Toxicity",* J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al*. (2003) "*The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Citotoxicity*", J Biol Chem 278:3466-3473); documentos US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCT WO00/61739A1; PCT WO01/292246A1; PCT WO02/311140A1; PCT WO02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 00061739; EA 01229125; US 20030115614; Okazaki *et al*. (2004) *"Fucose Depletion From Human IgGl Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgGl And FcGammaRIIIA*", JMB, 336: 1239-49.

La invención además abarca la incorporación de aminoácidos no naturales para generar los diacuerpos de la invención. Estos métodos son conocidos por los expertos en la técnica, como pueden ser aquellos que utilizan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas, véanse, por ejemplo, Wang *et al*. (2002) "*Expanding The Genetic Code*", Chem. Comm. 1: 1-11; Wang *et al*. (2001) "*Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli*", Science, 292: 498-500; van Hest *et al*. (2001) "*Protein-Based Materials, Toward A New Level Of Structural Control*", Chem. Comm. 19: 1897-1904, cada una de que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoacil-ARNt, véanse, por ejemplo, Tang *et al*. (2001) "*Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host*", J. Am. Chem. Soc. 123(44): 11089-11090; Kiick *et al*. (2001) "*Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli*", FEBS Lett. 502(1 -2):25-30.

En algunas realizaciones, la invención abarca métodos para modificar un dominio VL, VH o Fc de una molécula de la invención mediante la adición o deleción de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el hidrato de carbono de proteínas son bien conocidos en la técnica y están abarcados dentro de la invención, véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.218.149; el documento EP 0359096 B1; la publicación estadounidense n.º US 2002/0028486; el documento WO 03/035835; la publicación estadounidense n.º 2003/0115614; la patente estadounidense n.º 6.218.149; la patente estadounidense n.º 6.472.511.

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden construirse para comprender un dominio que sea un ligando de unión para el receptor Natural Killer Group 2D (NKG2D). Estos ligandos de unión, y particularmente aquellos que no se expresan en células normales, incluyen la molécula de histocompatibilidad 60 (H60), el producto del gen inducible temprano del ácido retinoico 1 (RAE-1), y el transcrito similar a proteína de unión UL16 murino 1 (MULT1) (Raulet D.H. (2003) "*Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands* ' Nature Rev. Immunol. 3: 781-790; Coudert, J.D. *et al*. (2005) "*Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells*;' Blood 106: 1711-1717). Ligandos adicionales reactivos con NKG2D humano incluyen las moléculas relacionadas con la cadena del MHC clase I polimórfica MICA y MICB (Diefenbach, A. *et al*. (1999) "*Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In* "Curr. Biol. 9(22):R851 - R8533; Bauer, S. *et al*. (1999) "*Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA*", Science 285(5428):727-729; Stephens, H.A. (2001) "*MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?*" Trends Immunol. 22:378-385.

La secuencia de MICA es ID SEC NO: 311:

MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH
LDGQPFLRCD RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL
AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW
TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV
LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT
QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
LVLQSHWQTF HVSAVAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAEG PELVSLQVLD
QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

La secuencia de MICB es ID SEC NO: 312:

PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE
DVLGAKTWDT ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED
SSTRGSRHFY YDGELFLSQN LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM
KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV SEGNITVTCR ASSFYPRNIT
LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNGTYQT WVATRIRQGE EQRFTCYMEH
SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKTS
AAEGP

Los anticuerpos que se unen específicamente al receptor de células T incluyen el anticuerpo anti-TCR BMA 031 (Kurrle, R. *et al*. (1989) "*BMA 031 - A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application*" Transplant Proc. 21 (1 Pt 1): 1017-1019; Nashan, B. *et al*. (1987) "*Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex*", Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. *et al*. (1991) "*Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell*", J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, C.W. *et al*. (1991) "*Construction, Expression And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human α/β T Cell Receptor"* J. Immunol. 147(12):4366-4373). Anticuerpos que se unen específicamente al receptor NKG2D incluyen KYK-2.0 (Kwong, KY *et al*. (2008) "*Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity*" J. Mol. Biol. 384: 1143-1156; y documento PCT/US09/54911).

Mediante el uso de tal diacuerpo, la célula diana ahora es redirigida para que sea una célula que pueda ser unida por células que ordenan (*array*) el receptor (NKG2D). El receptor NKG2D se expresa en todos los linfocitos citolíticos naturales humanos (y de otros mamíferos) (Bauer, S. *et al*. (1999) "*Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA*", Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. *et al*. (2002) "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing* "Immunity 17(1): 19-29) así como en todas las células T $CD8^+$ (Groh, V. *et al*. (2001) "*Costimulation Of CD8$\alpha\beta$ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells* "Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. *et al*. (2002) "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing*" Immunity 17(1): 19-29).

De modo alternativo, las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden construirse para comprender un dominio que sea un ligando de unión para el receptor de células T ("TCR"). El TCR es expresado de manera nativa por células T CD4+ o CD8+ y permite a tales células reconocer péptidos antigénicos que estén unidos y sean presentados por las proteínas del MCH clase I o clase II de células presentadoras de antígeno. El reconocimiento de un complejo pMHC (péptido-MHC) por un TCR inicia la propagación de una respuesta inmunitaria celular que da origen a la producción de citocinas y la lisis de la célula presentadora de antígeno (véanse, por ejemplo, Armstrong, K.M. *et al*. (2008) "*Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes",* Biochem. J. 415(Pt 2): 183-196; Willemsen, R. (2008) "*Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitope For Adoptive T-Cell Therapy",* Cytometry A. 73(11): 1093-1099; Beier, K.C. *et al*. (2007) "*Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation"* Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone. R. *et al*. (2005) "*Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes*" Am. J. Ther. 12(6):534-550).

Al construir tales moléculas de diacuerpo para que comprendan además un dominio de unión a epítopo capaz de unirse a, por ejemplo, un receptor presente en la superficie de una célula diana, tales moléculas de diacuerpo serán moléculas de DART y de este modo serán capaces de unirse a la célula diana y con ello provocar que las células

diana presenten el ligando de unión para el receptor Natural Killer Group 2D (NKG2D) o al TCR (cualquiera que esté presente en el diacuerpo unido a la célula diana) (véase, por ejemplo, Germain, C. *et al*. (2008) "*Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein*" Prot. Engineer. Design Selection 21(11):665-672).

Tales diacuerpos pueden utilizarse para redirigir cualquier célula diana deseada hacia una célula que sea una diana de la lisis de células mediada por células NK o citotoxicidad mediada por células T. En una realización, el dominio de unión a epítopo del diacuerpo capaz de unirse a un receptor presente en la superficie de una célula diana es un epítopo que se une a un antígeno asociado a tumor para redirigir tales células cancerosas hacia sustratos para la lisis celular mediada por células NK o citotoxicidad mediada por células T. De interés particular son los antígenos asociados a tumor, es decir, un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovario, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer cervicouterino, un antígeno de carcinoma de páncreas, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer de testículo, un antígeno de cáncer de tipo glioblastoma, un antígeno asociado con un tumor maligno de células B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma de Hodgkin o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

Los antígenos asociados a tumor apropiados para tal uso pueden ser A33 (un antígeno de carcinoma colorrectal; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov; 33(8):991-998); B1 (Egloff, A.M. *et al*. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); beta-catenina (Prange W. *et al*. 2003 J Pathol. 201 (2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. *et al*. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Supl. 3:274-81); CD5 (Calin, G.A. *et al*. 2006 Semin Oncol. 33(2): 167-73; CD19 (Troussard, X. *et al*. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); CD20 (Thomas, D.A. *et al*. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5): 1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. *et al*. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5;294:91-107); CD25 (Troussard, X. *et al*. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91 (9): 1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91 (9): 1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31 -7); CD40/CD154 (Messmer, D. *et al*. 2005 Ann N Y Acad Sci. 1062:51 -60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9): 1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. *et al*. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48; Chu, P.G. *et al*. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. *et al*. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); CDK4 (Lee, Y.M. *et al*. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); CEA (antígeno carcinoembrionario; Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. *et al*. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. *et al*. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico; Adenis, A. *et al*. 2003 Bull Cancer. 90 Spec No:S228-32); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. *et al*. 2002 Oncogene 21 (57):8732-40; Rimon, E. *et al*. 2004 Int J Oncol. 24(5): 1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. *et al*. 2006 Int J Cancer. 118(1): 123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. *et al*. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25); gp100 (Lotem, M. *et al*. 2006 J Immunother. 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S *et al*. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); E6 de papilomavirus humano/E7 de papilomavirus humano (DiMaio, D. *et al*. 2006 Adv Virus Res. 66: 125-59; KSA (17-1A) (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123: 157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. *et al*. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):377-82; MUC-1 (Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. *et al*. 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31); N-acetilglucosaminiltransferasa (Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6; 1473(1):21 -34); p15 (Gil, J. *et al*. 2006 Nat Rev Mol Cell Biol. 7(9):667-77); PSA (antígeno específico de próstata; Cracco, CM. *et al*. 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123: 157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91); receptor de TNF (receptor de TNF-α, receptor de TNF-β; o receptor de TNF-γ; van Horssen, R. *et al*. 2006 Oncologist. 11 (4):397-408; Gardnerova, M. *et al*. 2000 Curr Drug Targets. 1 (4):327-64); o receptor de VEGF (O'Dwyer. P.J. 2006 Oncologist. 11(9):992-8).

Antígenos asociados a tumor adicionales para tal uso (y las publicaciones que dan a conocer los anticuerpos reactivos específicos para tales antígenos) incluyen ADAM-9 (publicación de patente estadounidense n.º 2006/0172350; publicación PCT n.º WO 06/084075); ALCAM (publicación PCT n.º WO 03/093443); carboxipeptidasa M (publicación de patente estadounidense n.º 2006/0166291); CD46 (patente estadounidense n.º 7.148.038; publicación PCT n.º WO 03/032814); citoqueratina 8 (publicación PCT n.º WO 03/024191); receptores de efrina (y en particular EphA2 (patente estadounidense n.º 7.569.672; publicación PCT n.º WO 06/084226); integrina alfa-V-beta-6 (publicación PCT n.º WO 03/087340); JAM-3 (publicación PCT n.º WO 06/084078); KID3 (publicación PCT n.º WO 05/028498); KID31 (publicación PCT n.º WO 06/076584); LUCA-2 (publicación de patente estadounidense n.º 2006/0172349; publicación PCT n.º WO 06/083852); oncostatina M (receptor de oncostatina beta) (patente estadounidense n.º 7.572.896; publicación PCT n.º WO 06/084092); PIPA (patente estadounidense n.º 7.405.061; publicación PCT n.º WO 04/043239); RAAG10 (patente estadounidense n.º 7.527.969; publicación PCT n.º WO 04/001381); ROR1 (patente estadounidense n.º 5.843.749); TES7 (publicación PCT n.º WO 08/066691); y el receptor de transferrina (patente estadounidense n.º 7.572.895; publicación PCT n.º WO 05/121179).

También de interés son antígenos específicos para agentes infecciosos particulares, por ejemplo, agentes virales incluyendo, pero sin limitarse a virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis B (VHB), influenza, virus de papiloma humano (VPH), fiebre aftosa (virus de Coxsackie), el virus de la rabia, virus de herpes simple (VHS), y los agentes causales de gastroenteritis, incluidos los rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus y virus de Norwalk; agentes bacterianos incluyendo pero sin limitarse a, *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Vibrio cholerae, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae*, agentes micóticos y parásitos como *Giardia*.

De otro modo, tal epítopo puede unirse a un receptor de Fc (por ejemplo, FCγRI o FCγRII), de modo que, por ejemplo redirijan las células de leucemia monocítica aguda hacia sustratos para lisis celular mediada por células NK.

5.1 DOMINIOS DE UNIÓN A DIACUERPOS

Los diacuerpos de la presente invención comprenden dominios de unión a antígeno generalmente derivados de inmunoglobulinas o anticuerpos. Los anticuerpos de los que se derivan los dominios de unión utilizados en los métodos de la invención pueden ser de cualquier origen animal como aves y mamíferos (por ejemplo, humano, primate no humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo). Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Como se utiliza en el presente documento, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de las bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o bibliotecas de secuencias codificantes de inmunoglobulina humana, sintéticas o de ratones que expresen anticuerpos de genes humanos.

La invención considera el uso de cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de cáncer, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias o enfermedades infecciosas como fuente de dominios de unión para los diacuerpos de la invención. Los ejemplos no limitativos de los anticuerpos de cáncer conocidos se proporcionan en la sección 5.7.1 así como otros anticuerpos específicos para los antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos de cáncer enumerados en la sección 5.6.1; los ejemplos no limitativos de los anticuerpos conocidos para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad autoinmunitaria y enfermedad inflamatoria se proporcionan en la sección 5.7.2., así como anticuerpos contra antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos enumerados en la sección 5.6.2; en otras realizaciones es posible utilizar anticuerpos contra epítopos asociados con enfermedades infecciosas como se enumera en la sección 5.6.3. En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que han sido identificadas por los métodos de la invención con una función efectora conferida y/o afinidad potenciada para el FCγRIIB y una afinidad disminuida para FCγRIIIA respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo natural. Un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se utilizan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que se pueden manipular por ingeniería de acuerdo con la invención se presenta en la Tabla 9, y un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se utilizan para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios se presenta en la Tabla 10.

Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de los anticuerpos en humanos y ensayos de *detección in vitro*, puede ser preferible utilizar diacuerpos con dominios variables derivados de anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los dominios variables de anticuerpos completamente humanos son particularmente convenientes para el tratamiento terapéutico de individuos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo los métodos de presentación en fago antes descritos utilizando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes estadounidense n.º 4.444.887 y n.º 4.716.111; y las publicaciones internacionales n.os WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654. WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, una variante o un fragmento de éste, que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región de entramado que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana o una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado puede contener sustancialmente la totalidad de al menos uno, y por lo regular dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones de entramado son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

Las regiones de entramado y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR donadora o la región de entramado consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o deleción de al menos un residuo para que la CDR o residuo de entramado de ese sitio no corresponda a la secuencia consenso o al anticuerpo donador. Tales mutaciones, no obstante, preferiblemente no son extensas. Por lo regular, al menos el 75% de los residuos de los anticuerpo humanizados corresponderán con los de la región de entramado (FR) parental y las secuencias CDR, muy frecuentemente el 90%, y lo más preferiblemente más del 95%. Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo pero sin limitarse a, injerto de CDR (patente europea n.º EP 239400; publicación internacional n.º WO 91/09967; y patentes estadounidenses n.os 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), enchapado o recubrimiento (patentes europeas n.os EP 592106 y EP 519596; Padlan (1991) "*A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties*", Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka *et al*. (1994) "*Human-Engineered Monoclonal Antibodies Retain Full Specific Binding Activity By Preserving Non-CDR Complementarity-Modulating Residues*", Protein Engineering

7(6):805-814; y Roguska *et al*. (1994) "*Humanization Of Murine Monoclonal Antibodies Through Variable Domain Resurfacing",* Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973), intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5.565.332), y las técnicas descritas en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.os 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, publicación internacional n.º WO 9317105, Tan *et al*. (2002) "*'Superhumanized' Antibodies: Reduction Of Immunogenic Potential By Complementarity-Determining Region Grafting With Human GermLine Sequences: Application To An Anti-CD28",* J. Immunol. 169: 1119-25, Caldas *et al*. (2000) "*Design And Synthesis Of GermLine-Based Hemi-Humanized Single-Chain Fv Against The CD18 Surface Antigen",* Protein Eng. 13:353-60, Morea *et al*. (2000) "*Antibody Modeling: Implications For Engineering And Design*", Methods 20:267-79, Baca *et al*. (1997) "*Antibody Humanization Using Monovalent Phage Display*", J. Biol. Chem. 272: 10678-84, Roguska *et al*. (1996) "*A Comparison Of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized By CDR-Grafting And Variable Domain Resurfacing*", Protein Eng. 9:895-904, Couto *et al*. (1995) "*Designing Human Consensus Antibodies With Minimal Positional Templates*", Cancer Res. 55 (23 Supl.):5973s-5977s, Couto *et al*. (1995) "*Anti-BA46 Monoclonal Antibody Mc3: Humanization Using A Novel Positional Consensus And In Vivo And In vitro Characterization*", Cancer Res. 55: 1717-22, Sandhu (1994) "*A Rapid Procedure For The Humanization Of Monoclonal Antibodies",* Gene 150:409-10, Pedersen *et al*. (1994) "*Comparison Of Surface Accessible Residues In Human And Murine Immunoglobulin Fv Domains. Implication For Humanization Of Murine Antibodies*", J. Mol. Biol. 235:959-973, Jones *et al*. (1986) "*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse",* Nature 321:522-525, Riechmann *et al*. (1988) "*Reshaping Human Antibodies For Therapy*", Nature 332:323-327, y Presta (1992) "*Antibody Engineering",* Curr. Op. Biotech. 3(4):394-398. Con mucha frecuencia, los residuos de entramado de las regiones de entramado serán sustituidos por el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente, mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de la región de entramado se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los residuos CDR y de entramado para identificar los residuos de entramado importantes para la unión a antígeno y la comparación de secuencias para identificar los residuos de entramado inusuales en posiciones específicas. (Véanse, por ejemplo, Queen *et al*., patente estadounidense n.º 5.585.089; publicaciones estadounidenses n.os 2004/0049014 y 2003/0229208; patentes estadounidenses n.os 6.350.861; 6.180.370; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 y Riechmann *et al*. (1988) "*Reshaping Human Antibodies For Therapy*", Nature 332:323-327).

En la realización más preferida, el dominio de unión humanizado se une específicamente al mismo epítopo que el anticuerpo murino donador. Los expertos en la técnica se darán cuenta que la invención abarca el injerto de CDR de los anticuerpos en general. Por tanto, los anticuerpos donadores y aceptores pueden derivarse de animales de la misma especie e incluso la misma clase o subclase de anticuerpo. Más habitualmente, sin embargo, los anticuerpos donadores y aceptores se derivan de animales de diferente especie. Normalmente el anticuerpo donador es un anticuerpo no humano, como puede ser un Acm de roedor, y el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, al menos una CDR del anticuerpo donador se injerta en el anticuerpo humano. En otras realizaciones, al menos dos y preferiblemente las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDR de bucles estructurales o una combinación de estas. En algunas realizaciones, la invención abarca un anticuerpo contra FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada a la que se injerta CDR y al menos una cadena ligera a la que se injerta CDR.

Los diacuerpos que se utilizan en los métodos de la invención incluyen derivados que son modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al diacuerpo. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados de diacuerpos incluyen diacuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no convencionales.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo se derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina como pueden ser anticuerpos que tengan una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison (1985) "*Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies*", Science 229: 1202-1207; Oi *et al*. (1986) "*Chimeric Antibodies",* BioTechniques 4:214-221; Gillies *et al*. (1989) "*High-Level Expression Of Chimeric Antibodies Using Adapted cDNA Variable Region Cassettes*", J. Immunol. Methods 125: 191-202; y las patentes estadounidenses n.os 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397

Con mucha frecuencia, los residuos de entramado de las regiones de entramado serán sustituidos por el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar la unión a antígeno. Estas sustituciones de la región de entramado se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los residuos CDR y de entramado para identificar los residuos de entramado importantes para la unión a antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos de entramado inusuales en posiciones específicas. (Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.585.089; y Riechmann *et al*. (1988) "*Reshaping human antibodies For Therapy*", Nature 332:323-327.

Los anticuerpos monoclonales a partir de los que pueden prepararse los dominios de unión de los diacuerpos de la invención utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación de fago, o una combinación de estas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al*., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, págs. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos por la tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva a partir de un solo clon, incluido cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método mediante el que se produce.

Los métodos para producir y examinar anticuerpos específicos utilizando la tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitativo, es posible inmunizar ratones con un antígeno de interés o una célula que exprese tal antígeno. Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, los anticuerpos específicos para el antígeno se detectan en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos luego se fusionan mediante técnicas bien conocidas a cualquiera de las células de mieloma apropiadas. Se seleccionan y clonan los hibridomas por dilución limitante. Los clones de hibridomas entonces se someten a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica para determinar células que secreten anticuerpos capaces de unirse al antígeno. Se puede generar líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inoculando ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos. Los antígenos de interés incluyen, pero no se limitan a, antígenos asociados con los cánceres que se mencionan en la sección 5.8.1, antígenos asociados con las enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que se mencionan en la sección 5.8.2, antígenos asociados con las enfermedades infecciosas que se mencionan en la sección 5.8.3, y las toxinas que se mencionan en la sección 5.8.4.

También es posible generar anticuerpos utilizando diversos métodos de presentación en fago conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fago, los dominios funcionales de anticuerpo son presentados en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, tal fago puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno, como pueden ser el fragmento Fab y Fv o Fv estabilizado con enlaces disulfuro, expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, utilizando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. El fago utilizado en estos métodos normalmente son fagos filamentosos, como pueden ser fd y M13. Los dominios de unión a antígeno son expresados como proteína fusionada por métodos recombinantes a la proteína del gen III o gen VIII del fago. Los ejemplos de los métodos de presentación de fago que se pueden utilizar para preparar inmunoglobulinas, o fragmentos de estas, de la presente invención incluyen los dados a conocer en Brinkmann *et al*. (1995) "*Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments*", J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames *et al*. (1995) "*Conversion Of Murine Fobs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins*", J. Immunol. Methods, 184: 177-186; Kettleborough *et al*. (1994) "*Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole antibodies From These Antibody Fragments*", Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic *et al*. (1997) "*An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries*", Gene, 187:9-18; Burton *et al*. (1994) "*Human antibodies From Combinatorial Libraries*", Advances in Immunology, 57: 191-280; solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes estadounidenses n.os 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

La tecnología de presentación en fagos puede utilizarse para aumentar la afinidad de un anticuerpo para su antígeno. Esta técnica sería útil para obtener anticuerpos de alta afinidad. La tecnología, conocida como maduración por afinidad, emplea mutagénesis o paseo de CDR y reselección utilizando el antígeno relacionado para identificar los anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser *et al*. (1992) "*Dissection Of The Combining Site In A Humanized Anti-Tac Antibody*", J. Immunology 149:2607-2614). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos simples da como resultado un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácidos. Es posible construir bibliotecas que consisten en una combinación de clones variantes, cada uno de los que difiere en alteraciones de un solo aminoácido en una sola CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada residuo CDR. Los mutantes con afinidad de unión aumentada para el antígeno pueden examinarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Cualquier método de examen conocido en la técnica se puede utilizar para identificar anticuerpos mutantes con avidez aumentada para el antígeno (por ejemplo, ELISA) (véase Wu *et al*. (1998) "*Stepwise In vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb*", Proc Natl. Acad Sci. USA 95:6037-6042; Yelton *et al*. (1995) "*Affinity Maturation Of The Br96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis*", J. Immunology 155: 1994-2004). También es posible el paseo de CDR que asigna al azar la cadena ligera (véase Schier *et al*. (1996) "*Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The*

Antibody Binding Site", J. Mol. Bio. 263:551 -567).

La presente invención también abarca el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión que se describen en el presente documento o conocidos en la técnica con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones de entramado o CDR. Preferiblemente, las mutaciones de estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidez y/o afinidad de los dominios de unión para FCγRIIB al que se unen de manera inmunoespecífica. Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, inmunoensayos) se pueden utilizar para someter a ensayo la afinidad de un anticuerpo para un antígeno específico.

Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica pueden utilizarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento de éste, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, los derivados incluyen sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos respecto al anticuerpo original o fragmento de éste. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservadoras de aminoácidos realizadas en uno o más de los residuos de aminoácidos no esenciales previstos.

5.1.1 DIACUERPOS QUE CONTIENEN SITIOS DE UNIÓN A EPÍTOPO QUE SE UNEN DE MANERA INMUNOESPECÍFICA A FCγRIIB

En una realización específica, al menos uno de los dominios de unión de los diacuerpos de la invención es agonista para al menos una actividad de FCγRIIB. En una realización de la invención, dicha actividad es la inhibición de la señalización mediada por el receptor de células B. En otra realización, el dominio de unión inhibe la activación de células B, la proliferación de células B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular de células B, la progresión del ciclo celular o la actividad de una o más moléculas de la señalización posteriores en la ruta de transducción de señales de FCγRIIB. En todavía otra realización, el dominio de unión potencia la fosforilación de FCγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En otra realización de la invención, el dominio de unión inhibe la actividad MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de células B. En otra realización, el dominio de unión es agonista de la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una realización particular, dicho dominio de unión inhibe la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión de la invención estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, o inhiben la activación de los miembros de la familia de las MAP cinasas (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En todavía otra realización, los dominios de unión de la invención potencian la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión de la invención inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

En otra realización, los dominios de unión antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En una realización, tal actividad es la activación de la señalización mediada por el receptor de células B. En una realización particular, los dominios de unión potencian la actividad de células B, la proliferación de células B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular o la actividad de una o más moléculas de señalización posteriores en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En todavía otra realización particular, los dominios de unión disminuyen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En otra realización de la invención, los dominios de unión potencian la actividad de la MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de células B. En otra realización, los dominios de unión antagonizan la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una realización particular, los dominios de unión potencian la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, potencian la activación de los miembros de la familia de las MAP cinasas (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En todavía otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión potencian la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrofagos. En otra realización, los dominios de unión impiden la fagocitosis, el aclaramiento de partículas opsonizadas por macrófagos esplénicos.

En otra realización, al menos uno de los dominios de unión puede utilizarse para dirigir los diacuerpos de la invención a células que expresen FcγRIIB.

En una realización particular, uno de los dominios de unión se deriva de un anticuerpo monoclonal murino producido por el clon 2B6 o 3H7, con números de registro ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Los hibridomas productores de anticuerpos 2B6 y 3H7 se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en

materia de patentes, y los números de registro asignados PTA-4591 (para el hibridoma que produce 2B6) y PTA-4592 (para el hibridoma que produce 3H7), respectivamente, y se incorporan al presente documento como referencia. En una realización preferida, los dominios de unión son humanos o han sido humanizados, preferiblemente se derivan de una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6.

La invención también abarca diacuerpos con dominios de unión de otros anticuerpos, que se unen específicamente a FcγRIIB, preferiblemente FcγRIIB humano, más preferiblemente FcγRIIB humano, nativo, que se derivan de clones que incluyen, pero no se limitan a 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de registro ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas productores de los clones antes identificados fueron depositados según las disposiciones del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de, 2004, y se incorporan en el presente documento como referencia. En las realizaciones preferidas, los dominios de unión de los anticuerpos antes descritos son humanizados.

En una realización específica, los dominios de unión que se utilizan en los diacuerpos de la presente invención son de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno de éste (por ejemplo, que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (las CDR), preferiblemente las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra realización, el dominio de unión se une al mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal murino producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente y/o compite con el anticuerpo monoclonal murino producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una afinidad mayor que el dominio de unión se une a FcγRIIA.

La presente invención también abarca diacuerpos con dominios de unión que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es idéntica en al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y/o cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La presente invención además abarca diacuerpos con dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que el anticuerpo o fragmento de éste se une a FcγRIIA, y que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más de las CDR que es idéntica en al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, como puede ser las búsquedas de proteínas BLAST.

La presente invención también abarca el uso de diacuerpos que contienen dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que el dominio de unión se une a FcγRIIA, que son codificados por una secuencia de nucleótidos que se hibrida a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En una realización preferida, el dominio de unión se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprende una cadena ligera variable y/o cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable y/o cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En otra realización preferida, los dominios de unión se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, hibridación a ADN unido al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45ºC seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X / SDS al 0,1% a aproximadamente 50-65ºC, condiciones altamente rigurosas como puede ser la hibridación a ADN unido al filtro en SSC 6X a aproximadamente 45ºC seguido por uno o más lavados en SSC 0,1X / SDS al 0,2% a aproximadamente 60ºC, u otras condiciones rigurosas de hibridación cualesquiera conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al*, eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

La presente invención también abarca el uso de dominios de unión que contienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión antes descritos con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones de entramado o CDR. Preferiblemente, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o potencian la avidez y/o afinidad de los dominios de unión para FcγRIIB a los que estos se unen de manera inmunoespecífica. Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, inmunoensayos) pueden utilizarse para determinar la afinidad de un anticuerpo para un antígeno particular.

Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica se pueden utilizar para introducir mutaciones

en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento de éste, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que dan origen a sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, los derivados incluyen sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos respecto al anticuerpo original o fragmento de éste. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservadoras de aminoácidos realizadas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

En las realizaciones preferidas, los dominios de unión se derivan de anticuerpos humanizados. Un anticuerpo humanizado específico para FcγRIIB puede comprender sustancialmente todos de al menos uno, y por lo regular dos dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones de entramado son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

Los diacuerpos de la presente invención comprenden dominios variables humanizados específicos para FcγRIIB en los que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) han sido sustituidas por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donador que se une específicamente a FcγRIIB, con una afinidad mayor que FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados se unen al mismo epítopo que 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente.

En una realización preferida, las regiones CDR del dominio de unión a FcγRIIB humanizado se derivan de un anticuerpo murino específico para FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento comprenden alteraciones, incluyendo, pero sin limitarse a, deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos del anticuerpo aceptor, es decir, las regiones de entramado del dominio variable de cadena pesada y/o ligera humana necesarias para conservar la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donador. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de los anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento no consisten necesariamente en la secuencia de aminoácidos precisa de la región de entramado de una región variable del anticuerpo humano natural, sino que contiene diversas alteraciones, incluyendo, pero sin limitarse a, deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos que alteren la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, que mejoren las propiedades de unión de una región del anticuerpo humanizado que es específica para la misma diana que el anticuerpo específico para FcγRIIB murino. En la mayor parte de las realizaciones preferidas, se realiza una cantidad mínima de alteraciones a la región de entramado con el fin de evitar introducciones a gran escala de residuos de entramado no humanos y para garantizar una inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en los humanos. El anticuerpo monoclonal donador preferiblemente es un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

En una realización específica, el dominio de unión abarca los dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que el anticuerpo se une a FcγRIIA, en donde el anticuerpo con injerto de CDR comprende un dominio de región variable de cadena pesada variable que comprende residuos de entramado del anticuerpo del receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donador, que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que el anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. En otra realización específica, los diacuerpos de la invención comprenden dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que el anticuerpo se une a FcγRIIA, en donde el anticuerpo con injerto de CDR comprende un dominio de región variable de cadena ligera que comprende residuos de la región de entramado del anticuerpo del receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que el anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, el monoclonal anticuerpo producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1 D5, 2E1, 2H9, 2D1 o 1F2.

Los dominios variables anti-FcγRIIB humanizados utilizados en la invención pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (ID SEC NO: 24 o ID SEC NO: 25) y/o CDR2 (ID SEC NO: 26 o ID SEC NO: 27) y/o CDR3 (ID SEC NO: 28 o ID SEC NO: 29) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (ID SEC NO: 30 o ID SEC NO: 31) y/o una CDR2 (ID SEC NO: 32, ID SEC NO: 33, ID SEC NO: 34 o ID SEC NO: 35) y/o CDR3 (ID SEC NO: 36 o ID SEC NO: 37).

En una realización específica, el diacuerpo comprende los dominios variables de un anticuerpo 2B6 humanizado, en donde la región VH consiste en los segmentos FR del segmento VH de la línea germinal humana VH1-18 (Matsuda *et al*. (1998) "*The Complete Nucleotide Sequence Of The Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus",* J. Exp. Med. 188:2151-2162) y JH6 (Ravetch *et al*. (1981) "*Structure Of The Human Immunoglobulin Mu Locus: Characterization Of Embryonic And Rearranged J And D Genes",* Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones CDR de la VH de 2B6, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID SEC NO: 24, ID SEC NO: 26 o ID SEC NO: 28. En una realización, VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 38. En otra realización el dominio VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de la VH del Hu2B6, ID SEC NO: 85, y puede

estar codificado por la secuencia de nucleótidos de la ID SEC NO: 86. En otra realización específica, el diacuerpo además contiene una región VL, que consiste en los segmentos FR del segmento VL de la línea germinal humana VK-A26 (Lautner-Rieske *et al*. (1992) "*The Human Immunoglobulin Kappa Locus. Characterization Of The Duplicated A Regions*", Eur. J. Immunol. 22: 1023-1029) y JK4 (Hieter *et al*. (1982) "*Evolution Of Human Immunoglobulin Kappa J Region Genes",* J. Biol. Chem. 257: 1516-22), y una o más regiones CDR de VL de 2B6, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID SEC NO: 30, ID SEC NO: 32, ID SEC NO: 33, ID SEC NO: 34 e ID SEC NO: 36. En una realización, VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de la ID SEC NO: 39; ID SEC NO: 40 o ID SEC NO: 41. En una realización específica, VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de VL Hu2B6, ID SEC NO: 87, y puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos que se proporciona en la ID SEC NO: 88.

En otra realización específica, el diacuerpo tiene dominios variables procedentes de un anticuerpo 3H7 humanizado, en donde la región VH consiste en los segmentos FR procedentes del segmento VH de la línea germinal humana y las regiones CDR de VH de 3H7, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID SEC NO. 35. En otra realización específica, el anticuerpo 3H7 humanizado además contiene las regiones VL, que consisten en los segmentos FR de un segmento VL de la línea germinal humana y las regiones CDR de VL de 3H7, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID SEC NO: 42.

En particular, los dominios de unión se unen de manera inmunoespecífica a los dominios extracelulares de la proteína FcγRIIB humana nativa y comprenden (o de otro modo consisten en) las secuencias de CDR de los anticuerpos 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, o cualquiera de las siguientes combinaciones: una CDR1 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; CDR2 de VH y CDR2 de VL; una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH y una CDR1 de VH; una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH1, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL, y una CDR3 de VL; o cualquier combinación de las CDR de VH y CDR de VL descritas en el presente documento.

Los anticuerpos para derivar dominios de unión que han de ser incluidos en los diacuerpos de la invención además pueden caracterizarse mediante mapeo de epítopos, de modo que sea posible seleccionar anticuerpos que tengan la mayor especificidad para FcγRIIB en comparación con FcγRIIA. Los métodos de mapeo de epítopos de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica y están abarcados dentro de los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión que comprenden una o más regiones de FcγRIIB pueden utilizarse para mapear el epítopo de un anticuerpo de la invención. En una realización específica, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionada a la parte Fc de una IgG2 humana. Cada proteína de fusión además puede comprender sustituciones y/o reemplazos de aminoácidos de ciertas regiones del receptor por la región correspondiente de un receptor homólogo, por ejemplo, FcγRIIA, como se muestra en la Tabla 2 siguiente. Las moléculas pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión a IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el extremo carboxilo-terminal de FcγRIIB y el último con el extremo carboxilo-terminal de FcγRIIA y pueden utilizarse para diferenciar la unión C-terminal. Los demás tienen sustituciones en el sitio de unión a IgG y el extremo N-terminal de FcγRIIA o FcγRIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula receptora donde se unirán los anticuerpos.

TABLA 2. Lista de las proteínas de fusión que pueden utilizarse para investigar el epítopo de los anticuerpos anti-FcγRIIB monoclonales. Los residuos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión a IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia de FcγRIIA están en negrita.

Plásmido	Receptor	N-terminal	172-180	ID SEC NO:	C-terminal
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	43	APS------SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	**Q**KFSRLDPN	44	APS------SS (IIb)
pMGX127		IIa	**Q**KFSRLDP**T**	45	APS------SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSRLDP**T**	46	APS------SS (IIb)
pMGX129		IIa	**Q**KFS**H**LDPT	47	APS------SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFS**H**LDPT	48	APS------SS (IIb)
pMGX131		IIa	**Q**KFSRLDPN	49	VPSMGSSS(IIa)
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	50	VPSMGSSS(IIa)
pMGX133	RIIa-131R	IIa	**Q**KFSRLDP**T**	51	VPSMGSSS(IIa)
pMGX134	RIIa-131H	IIa	**Q**KFS**H**LDPT	52	VPSMGSSS(IIa)
pMGX135		IIb	KKFSRLDP**T**	53	VPSMGSSS(IIa)
pMGX136		IIb	KKFS**H**LDPT	54	VPSMGSSS(IIa)
Nota : APSSS es ID SEC NO: **309**; VPSMGSSS es ID SEC NO: **310**					

Las proteínas de fusión pueden utilizarse en cualquier ensayo bioquímico para determinar la unión de un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención, por ejemplo, un ensayo ELISA. En otras realizaciones, es posible realizar una confirmación adicional de la especificidad por el epítopo utilizando péptidos con residuos específicos reemplazados por los de la secuencia de FcγRIIA.

Es posible caracterizar tos anticuerpos mediante ensayos para identificar la función de los anticuerpos de la invención, en particular la actividad para modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, ensayos de caracterización de la invención pueden medir la fosforilación de los residuos de tirosina del motivo ITIM de FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de células B. Los ensayos de caracterización de la invención pueden ser ensayos a base de células o libres de células.

Se ha establecido bien en la técnica que en los mastocitos la coagregación de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, da origen a la inhibición de la desgranulación, la movilización de calcio y la producción de citocinas inducidas por el antígeno (Metcalfe D.D. *et al*. (1997) "*Mast Cells*", Physiol. Rev. 77: 1033-1079; Long E.O. (1999) "*Regulation Of Immune Responses Through Inhibitory Receptors*", Annu. Rev. Immunol. 17: 875-904). Los detalles moleculares de esta ruta de señalización se han elucidado recientemente (Ott V. L. (2002) "*Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling",* J. Immunol. 162(9):4430-4439). Una vez coagregado con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente en tirosina en su motivo ITIM, y luego recluta inositol-5-fosfatasa que contiene la homología de Src-2 (SHIP), una inositol polifosfato 5-fosfatasa que contiene el dominio SH2, que a su vez se fosforila y se asocia con Shc y $p62^{dok}$ ($p62^{dok}$ es el prototipo de una familia de moléculas adaptadoras que incluyen dominios de señalización, como puede ser un dominio de homología de pleckstrina amino-terminal (dominio PH), un dominio PTB, y una región carboxilo-terminal que contiene motivos PXXP y numerosos sitios de fosforilación (Carpino *et al*. (1997) "*p62(dok): A Constitutively Tyrosine-Fosforylated, GAP-Associated Protein In Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells*", Cell, 88: 197-204; Yamanshi *et al*. (1997) "*Identification Of The Ab1-And rasGAP-Associated 62 kDa Protein As A Docking Protein, Dok",* Cell, 88:205-211).

Los anticuerpos anti-FcγRIIB que se utilizan en la invención del mismo modo se pueden caracterizar por su capacidad para modular una o más respuestas mediadas por IgE. Preferiblemente, las líneas celulares que coexpresan el receptor de alta afinidad para IgE y el receptor de baja afinidad para receptor FcγRIIB se utilizarán para caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB para modular las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, es posible utilizar células de una línea celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al*. (1981) "*IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones*", Eur. J. Immunol. 11: 317-323, transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa. RBL-2H3 es una línea celular de rata bien caracterizada que ha sido utilizada ampliamente para estudiar mecanismos de señalización después de la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL-2H3 y se coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización de calcio, desgranulación y producción de citocinas inducidas por FcεRI (Malbec *et al*. (1998) "*Fc Epsilon Receptor I-Associated Lyn-Dependent Fosforylation Of Fc Gamma Receptor IIB During Negative Regulation Of Mast Cell Activation",* J. Immunol. 160: 1647-1658; Daeron *et al*. (1995) "*Regulation Of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation By Murine Low-Affinity IgG Receptors",* J. Clin. Invest. 95:577; Ott V. L. (2002) "*Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling*", J. Immunol. 162(9):4430-4439).

Los anticuerpos que se utilizan en la invención también pueden caracterizarse por su inhibición de la activación de los mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, las células de una línea celular de leucemia basófila de ratas (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al*. (1981) "*IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones",* Eur. J. Immunol. 11:317-323) que se ha transfectado con FcγRIIB son sensibilizadas con IgE y estimuladas con fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos anti-IgG de ratón producidos en conejo, para agregar solo FcεRI, o con anticuerpos anti-IgG de ratón producidos en conejo, completos para coagregar FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de las moléculas señalizadoras posteriores puede someterse a ensayo tras la adición de anticuerpos de la invención a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, es posible someter a ensayo la fosforilación de tirosinas de FcγRIIB y el reclutamiento y fosforilación de SHIP, la activación de los miembros de la familia de las MAP cinasas, incluyendo pero sin limitarse a Erk1, Erk2, JNK o p38; y la fosforilación de tirosinas de $p62^{dok}$ y su asociación con SHIP y RasGAP.

Un ensayo a modo de ejemplo para determinar la inhibición de la activación de los mastocitos inducida por FcεRI mediante los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: transfección de células RBL-H23 con FcγRIIB humano; la sensibilización de las células RBL-H23 con IgE; la estimulación de células RBL-H23 con el fragmento $F(ab')_2$ del anticuerpo anti-IgG de ratón producido en conejo (para agregar solo FcεRI y desencadenar la señalización mediada por FcεRI, como control), o la estimulación de células RBL-H23 con anticuerpo anti-IgG de ratón producido en conejo, completo (para agregar FcγRIIB y FcεRI, dando como resultado la inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que hayan sido estimuladas con anticuerpos anti-IgG de ratón producidos en conejo completos además pueden incubarse previamente con los anticuerpos de la invención. La medición de la actividad dependiente de FcεRI de células que se han incubado previamente con los anticuerpos de la invención y las células que no se han incubado previamente con los anticuerpos de la invención, y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcεRI en estas células indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcεRI por los anticuerpos de la invención.

El ensayo a modo de ejemplo antes descrito puede usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloqueen la unión del ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y antagonice la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcεRI. Este ensayo del mismo modo identifica a los anticuerpos que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcεRI y son agonistas de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI fomentando la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.

En algunas realizaciones, los diacuerpos anti-FcγRIIB, que contienen los dominios de unión a epítopo de los anticuerpos anti-FcγRIIB identificados, descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, de la invención, se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE monitorizando y/o midiendo la desgranulación de los mastocitos o basófilos, preferiblemente en un ensayo a base de células. Preferiblemente, los mastocitos o basófilos que se utilizan en tales ensayos han sido manipulados por ingeniería para contener FcγRIIB humano utilizando métodos recombinantes convencionales conocidos por un experto en la técnica. En una realización específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa (enzima contenida en los gránulos) a base de células. La liberación de β-hexosaminidasa a partir de los mastocitos y basófilos es un acontecimiento principal en un estado alérgico e inflamatorio (Aketani *et al*. (2001) "*Correlation Between Cytosolic Calcium Concentration And Degranulation In RBL-2H3 Cells In The Presence Of Various Concentrations Of Antigen-Specific IgEs*", Immunol. Lett. 75: 185-189; Aketani *et al*. (2000) "*A Screening Method For Antigen-Specific IgE Using Mast Cells Based On Intracellular Calcium Signaling",* Anal. Chem. 72: 2653-2658). La liberación de otros mediadores inflamatorios, incluyendo pero sin limitarse a, serotonina e histamina puede someterse a ensayo para medir una respuesta mediada por IgE de acuerdo con los métodos de la invención. Aunque no se pretende restringirse a ningún mecanismo de acción particular, la liberación de los gránulos, como pueden ser aquellos que contienen β-hexosaminidasa a partir de los mastocitos y basófilos es un proceso que depende de la concentración de calcio intracelular, que se inicia mediante la reticulación de los FcγRI con antígenos multivalentes.

La posibilidad de estudiar mastocitos humanos ha estado limitada por la ausencia de cultivos de mastocitos humanos a largo plazo, apropiados. En fechas recientes dos líneas celulares de mastocitos humanos dependientes del factor de células madre novedosas, denominadas LAD1 y LAD2, fueron establecidas a partir de aspirados de médula ósea de un paciente con leucemia / sarcoma de mastocitos (Kirshenbaum *et al*. (2003) "*Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation OfFcRI o FcγRI",* Leukemia research, 27:677-82, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.). Se ha descrito que ambas líneas celulares expresan FcεRI y algunos marcadores de mastocitos humanos. Las células LAD1 y 2 pueden utilizarse para evaluar el efecto de los anticuerpos de la invención sobre las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, los ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basados en células, como pueden ser los descritos antes, pueden utilizarse en células LAD para determinar alguna modulación de la respuesta mediadas por IgE utilizando los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención. En un ensayo a modo de ejemplo, los mastocitos humanos, por ejemplo, LAD1, se sensibilizan con IgE humana quimérica anti-nitrofenol (NP) y se exponen a BSA-NP, el antígeno polivalente, y se monitoriza la desgranulación celular midiendo la β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante

(Kirshenbaum *et al*. (2003) "*Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI o FcγRI",* Leukemia research, 27:677-82, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.).

En algunas realizaciones, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, tal como se determina utilizando los métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, tinción para FACS, puede ser difícil monitorizar y/o detectar diferencias en la activación de la ruta inhibitoria mediada por los diacuerpos anti-FcγRIIB de la invención. La invención de este modo abarca métodos alternativos, con los que se puede regular por incremento la expresión de FcγRIIB utilizando citocinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que puede regularse por incremento altamente FcγRIIB en líneas celulares de monocitos humanos, por ejemplo, THP1 y U937, (Tridandapani *et al*. (2002) "*Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RUB In Human Monocytic Cells* "J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop *et al*. (2001) "*Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines",* J. of Immunol., 166: 531-537) mediante IL4. Se ha descrito que la diferenciación de células U937 con dibutiril AMP cíclico aumenta la expresión de FcγRII (Cameron *et al*. (2002) "*Differentiation Of The Human Monocyte Cell Line, U937, With Dibutyryl Cyclic AMP Induces The Expression Of The Receptor Fc inhibitor. FcgammaRIIB*", Immunology Letters 83, 171 -179). De este modo, la expresión endógena de FcγRIIB en mastocitos humanos para utilizarlos en los métodos de la invención puede regularse por incremento utilizando citocinas, por ejemplo, IL-4, IL-13 con el fin de potenciar la sensibilidad de detección.

Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden someterse a ensayo para determinar la inhibición de la señalización mediada por el receptor de células B (BCR). La señalización mediada por BCR puede incluir al menos una o más respuestas biológicas posteriores, como puede ser la activación y proliferación de células B, la producción de anticuerpos, etc. La coagregación de FcγRIIB y BCR da origen a la inhibición de la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. Además, la coagregación de FcγRIIB y BCR conduce a la inhibición de la señalización mediada por BCR.

Específicamente, la señalización mediada por, BCR comprende al menos uno o más de lo siguientes: modulación de las moléculas señalizadoras posteriores (por ejemplo, el estado de fosforilación de FcγRIIB, el reclutamiento de SHIP, la localización de Btk y/o PLCγ, la actividad MAP cinasa, el reclutamiento de Akt (señal anti-apoptótica), la movilización del calcio, la progresión del ciclo celular y la proliferación celular.

Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR están mediadas a través de SHIP, en fechas recientes se ha demostrado que células B activadas con lipopolisacárido (LPS) derivadas de ratones deficientes en SHIP muestran inhibición significativa de la movilización de calcio mediada por FcγRIIB, producción de $Ins(1,4,5)P_3$ y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler *et al*. (2001) "*Partially Distinct Molecular Mechanisms Mediate Inhibitory FcgammaRIIB Signaling In Resting And Activated B Cells* "Journal of Immunology, 167(1): 204-211). Por consiguiente, para caracterizar los anticuerpos de la invención es posible utilizar células B *ex vivo* procedentes de ratones deficientes en SHIP. Un ensayo a modo de ejemplo para determinar la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR por los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: el aislamiento de células B esplénicas de ratones deficientes en SHIP, la activación de tales células con lipopolisacárido y la estimulación de tales células con $F(ab')_2$ anti-IgM para agregar BCR o con anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Las células que hayan sido estimuladas con anti-IgM intacta para coagregar BCR con FcγRIIB se pueden preincubar además con los anticuerpos de la invención. La actividad de células dependiente de FcγRIIB puede medirse mediante técnicas convencionales conocidas. La comparación del nivel de la actividad dependiente de FcγRIIB en células que han sido previamente incubadas con los anticuerpos, y células que no han sido previamente incubadas, y la comparación de los niveles indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por los anticuerpos.

La medición de la actividad dependiente de FcγRIIB puede incluir, por ejemplo, medición de la movilización del calcio intracelular por citometría de flujo, la medición de la fosforilación de Akt y/o Erk, la medición de la acumulación de $PI(3,4,5)P_3$ mediada por BCR o la medición de la proliferación de células B mediada por FcγRIIB.

Es posible utilizar ensayos, por ejemplo, para identificar diacuerpos o anticuerpos anti-FcγRIIB para utilizarlos en la invención que modulen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR bloqueando el sitio de unión al ligando (IgG) frente al receptor de FcγRIIB y antagonizando la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR impidiendo la coagregación de FcγRIIB y BCR. También es posible utilizar los ensayos para identificar anticuerpos que potencien la coagregación de FcγRIIB y BCR y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR .

Los anticuerpos frente a FcγRIIB también se pueden someter a ensayo para la señalización mediada por FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcγRIIB con un receptor portador del motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptor (ITAM) actúa para regular por disminución la fagocitosis mediada por FcγR utilizando SHIP como su efector (Tridandapani *et al*. (2002) "*Regulated Expression And Inhibitory Function Of*

Fcgamma RUB In Human Monocytic Cells", J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). La coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB da como resultado la rápida fosforilación del residuo de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, dando origen a una potenciación de la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB da origen a la regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina cinasa implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

Los diacuerpos contra FcγRIIB también pueden someterse a ensayo para la inhibición de fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, las células de una línea celular monocítica humana, THP-1 puede estimularse con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 contra FcγRII y el anticuerpo anti-ratón producido en cabra (para agregar solo FcγRIIA), o con el anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 completo y el anticuerpo anti-ratón producido en cabra (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB). En este sistema, la modulación de las moléculas señalizadoras posteriores, como puede ser fosforilación de tirosinas de FcγRIIB, la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, la fosforilación de Akt y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa se pueden someter a ensayo tras la adición de moléculas de la invención a las células estimuladas. Además, la eficiencia fagocítica dependiente de FcγRIIB de la línea celular monocítica se puede medir directamente en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención.

Otro ensayo a modo de ejemplo para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrofagos humanos por los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: estimular las células THP-1 con el fragmento Fab del anticuerpo frente a FcγRII de ratón IV.3 y el anticuerpo anti-ratón producido en cabra (para agregar solo FcγRIIA y desencadenar la señalización mediada por FcγRIIA); o con el anticuerpo frente a FcγRII de ratón y el anticuerpo anti-ratón producido en cabra (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por FcγRIIA. Las células que han sido estimuladas con el anticuerpo anti-FcγRII de ratón y el anticuerpo anti-ratón producido en cabra además se pueden incubar previamente con las moléculas de la invención. La medición de la actividad dependiente de FcγRIIA de células estimuladas que hayan sido preincubadas con moléculas de la invención y células que no hayan sido previamente incubadas con anticuerpos de la invención y la comparación de niveles de actividad dependiente de FcγRIIA en estas células indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención.

El ensayo a modo de ejemplo que se describe se puede utilizar, por ejemplo, para identificar dominios de unión que bloqueen la unión a ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Del mismo modo este ensayo identifica los dominios de unión que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA y son agonistas de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

Los dominios de unión a FcγRIIB de interés se pueden someter a ensayo al tiempo que comprenden los anticuerpos midiendo la capacidad de células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG marcada con fluoresceína mediante los métodos antes descritos (Tridandapani *et al*. (2000) "*The Adapter Protein LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells",* J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo a modo de ejemplo para medir la fagocitosis comprende: tratar células THP-1 con los anticuerpos de la invención o con un anticuerpo de control que no se una a FcγRII, comparar los niveles de actividad de tales células, en donde la diferencia de las actividades de las células (por ejemplo, la actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubierto con IgG), actividad de adherencia (el número total de SRBC unido a células THP-1), y la tasa fagocítica) indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención. Este ensayo puede utilizarse para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloqueen la unión a ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la fagocitosis. Este ensayo también puede identificar anticuerpos que potencian la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

En una realización preferida, los dominios de unión modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos en al menos una o más de las siguientes formas: modulación de moléculas señalizadoras posteriores (por ejemplo, la modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, la modulación de la fosforilación de SHIP, modulación de la asociación de SHIP y Shc, modulación de la fosforilación de Akt, modulación de la fosforilación de proteínas adicionales de alrededor de 120 y 60-65 kDa) y modulación de la fagocitosis.

5.1.2 DOMINIOS DE UNIÓN A CD16A

La siguiente sección analiza las proteínas de unión a CD16A que pueden utilizarse como fuentes para las regiones variables de cadena ligera y pesada para la producción de diacuerpos covalentes. En la presente invención, las proteínas de unión a CD16A incluyen moléculas que contienen los dominios VL y VH de los anticuerpos anti-CD16A, cuyos dominios VH y VL se utilizan para la producción de los diacuerpos de la presente invención.

Es posible utilizar diversas proteínas de unión a CD16A en relación con la presente invención. Las proteínas de

unión a CD16A apropiadas incluyen anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como los fragmentos de anticuerpos de unión a CD16A (por ejemplo, scFv o anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, minicuerpos) y otras proteínas similares a anticuerpo que se unen a CD16A mediante una interacción con un dominio de región variable de cadena ligera, un dominio de región variable de cadena pesada, o ambos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a CD16A para utilizarla de acuerdo con la invención comprende un dominio VL y/o VH que tiene una o más CDR con secuencias derivadas de un anticuerpo anti-CD16A no humano, como puede ser un anticuerpo anti-CD16A de ratón, o una o más regiones de de entramado derivadas de las secuencias de entramado de una o más inmunoglobulinas humanas. Se conocen diversos anticuerpos monoclonales anti-CD16A no humanos, a partir de los que pueden obtenerse CDR y otras secuencias (véase, por ejemplo, Tamm *et al*. (1996) "*The Binding Epitopes Of Human CD16 (Fc gamma Rill) Monoclonal Antibodies. Implications For Ligand Binding*", J. Imm. 157: 1576-81; Fleit *et al*. (1989) p.159; LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC CELLS, Reinherz *et al*., eds. Nueva York: Springer-Verlag; (1986); LEUCOCYTE TYPING III: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS McMichael A J, ed., Oxford: Oxford University Press, 1986); LEUKOCYTE TYPING IV: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kapp *et al*., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Schlossman *et al*., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kishimoto, ed. Taylor & Francis. Además, como se demuestra en los ejemplos, proteínas de unión a CD16A novedosas que reconozcan CD16A humana expresada en células pueden obtenerse utilizando métodos bien conocidos para la producción y selección de anticuerpos monoclonales o proteínas de unión relacionadas (por ejemplo, la tecnología del hibridoma, presentación de fagos y similares). Véanse, por ejemplo, O'Connell *et al*. (2002) "*Phage Versus Phagemid Libraries For Generation Of Human Monoclonal Antibodies*", J. Mol. Biol. 321: 49-56; Hoogenboom *et al* (2000) "*Natural And Designer Binding Sites Made By Phage Display Technology",* Imm. Today 21: 371078; Krebs *et al*. (2001) "*High-Throughput Generation And Engineering Of Recombinant Human Antibodies",* J. Imm. Methods 254:67-84; y otras referencias mencionadas en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales de una especie no humana pueden ser quimerizados o humanizados utilizando técnicas de humanización de anticuerpos conocidas en la técnica.

Como alternativa, es posible producir anticuerpos completamente humanos contra CD16A utilizando animales transgénicos que tengan elementos de un sistema inmunitario humano (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 5.569.825 y 5.545.806), utilizando células sanguíneas periféricas humanas (Casali *et al*. (1986) "*Human Monoclonals From Antigen-Specific Selection Of B Lymphocytes And Transformation By EBV",* Science 234:476-479), mediante el examen de una biblioteca de ADN a partir de células B humanas de acuerdo con el protocolo general que se indica en Huse *et al*. (1989) "*Generation Of A Large Combinatorial Library Of The Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda*", Science 246: 1275-1281, y por otros métodos.

En una realización preferida, el donador de unión es del anticuerpo 3G8 o una versión humanizada de éste, por ejemplo, como pueden ser aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2004/0010124, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Se considera que, para determinados fines, puede ser ventajoso utilizar proteínas de unión a CD16A que se unan al receptor de CD16A en el mismo epítopo al que se une 3G8, o al menos suficientemente cerca de este epítopo para bloquear la unión por 3G8. Los métodos para el mapeo de epítopos y los experimentos de unión competitiva para identificar proteínas de unión con las propiedades de unión deseadas son bien conocidos por los expertos en la técnica de la inmunología experimental. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, mencionado anteriormente; Stahli *et al*. (1983) "*Distinction Of Epitopes By Monoclonal Antibodies*", Methods in Enzymology 92:242-253; Kirkland *et al*. (1986) "*Analysis Of The Fine Specificity And Cross-Reactivity Of Monoclonal Anti-Lipid A Antibodies*", J. Immunol. 137:3614-3619; Morel *et al*. (1988) "*Monoclonal Antibodies To Bovine Serum Albumin: Affinity And Specificity Determinations*", Molec. Immunol. 25:7-15; Cheung *et al*. (1990) "*Epitope-Specific Antibody Response To The Surface Antigen Of Duck Hepatitis B Virus In Infected Ducks",* Virology 176:546-552; y Moldenhauer *et al*. (1990) "*Identity Of HML-1 Antigen On Intestinal Intraepithelial T Cells And Of B-lyl Antigen On Hairy Cell Leukaemia",* Scand. J. Immunol. 32:77-82. Por ejemplo, es posible determinar si dos anticuerpos se unen al mismo sitio utilizando uno de los anticuerpos para capturar el antígeno en una placa para ELISA, y luego midiendo la capacidad del segundo anticuerpo para unirse al antígeno capturado. También es posible obtener una comparación de epítopos etiquetando un primer anticuerpo, de manera directa o indirecta, con una enzima, radionúclido o fluoróforo, y midiendo la capacidad de un segundo anticuerpo no marcado para inhibir la unión del primer anticuerpo al antígeno en las células, en disolución o en una fase sólida.

También es posible medir la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión del receptor de CD16A a complejos inmunitarios formados en placas para ELISA. Tales complejos inmunitarios se forman primero recubriendo la placa con un antígeno como fluoresceína, luego aplicando a la placa un anticuerpo anti-fluoresceína específico. Este complejo inmunitario luego sirve como ligando para los receptores de Fc solubles, como puede ser sFcRIIIa. Como alternativa, es posible formar y etiquetar, directa o indirectamente, un complejo inmunitario soluble con una enzima, radionúclido o fluoróforo. Luego puede medirse la capacidad de los anticuerpos para inhibir en disolución o en fase sólida la unión de estos complejos inmunitarios marcados a los receptores de Fc en las células.

Las proteínas de unión a CD16A de la invención pueden contener o no una región Fc de inmunoglobulina humana. Las regiones Fc no están presentes, por ejemplo, en las proteínas de unión a scFv. Las regiones Fc están

presentes, por ejemplo, en anticuerpos IgG monoclonales tetraméricos humanos o humanizados. Como se describió anteriormente, en algunas realizaciones de la presente invención, la proteína de unión a CD16A incluye una región Fc que tiene una función efectora alterada, por ejemplo, afinidad disminuida para un ligando efector como puede ser un receptor de Fc o componente C1 del complemento en comparación con la región Fc no alterada (por ejemplo, el fragmento Fc de las proteínas IgG1 naturales). En una realización, la región Fc no está glicosilada en el aminoácido de la región Fc correspondiente a la posición 297. Tales anticuerpos carecen de la función efectora de Fc.

Por tanto, la proteína de unión a CD16A puede no presentar unión mediada por Fc a un ligando efector, como puede ser un receptor de Fc o el componente C1 del complemento debido a la ausencia del dominio Fc en la proteína de unión mientras, en otros casos, la falta de unión o la función efectora se debe a una alteración de la región constante del anticuerpo.

5.1.2.1 Proteínas de unión a CD16A que contienen secuencias CDR similares a las secuencias CDR de un Acm 3G8.

Las proteínas de unión a CD16A que pueden utilizarse en la práctica de la invención incluyen proteínas que comprenden una secuencia CDR derivada de (es decir, que tiene una secuencia, la misma que o similar a) las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. Las moléculas de ADNc complementarias que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal 3G8 de ratón, incluidas las secuencias que codifican CDR, fueron clonadas y secuenciadas como se describe. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de 3G8 se proporcionan más adelante. Empleando la región variable y las secuencias CDR de ratón, se produjo y analizó las propiedades de una gran cantidad de anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprendían regiones determinantes de la complementariedad derivadas de las CDR de 3G8. Para identificar los anticuerpos humanizados que se unen a CD16A con alta afinidad y tienen otras propiedades deseables, se produjeron cadenas pesadas del anticuerpo que comprendía una región VH con las CDR derivadas de 3G8 y se combinaron (por coexpresión) con las cadenas ligeras del anticuerpo que comprendían una región VL con las CDR derivadas de 3G8 para producir un anticuerpo tetramérico para el análisis. Las propiedades de los anticuerpos tetraméricos derivados fueron determinadas como se describe más adelante. Como se describe más adelante, las proteínas de unión a CD16A que comprenden CDR de 3G8, como pueden ser las proteínas de anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento, pueden utilizarse de acuerdo con la invención.

5.1.2.1.1 Región VH

En un aspecto, la proteína de unión a CD16A de la invención puede contener un dominio variable de cadena pesada en el que al menos una CDR (y por lo regular tres CDR) tienen la secuencia de una CDR (y más comúnmente las tres CDR) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para el que las partes restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de y sustancialmente similares a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

En un aspecto, la invención aporta un anticuerpo 3G8 humanizado o fragmento del anticuerpo que contiene CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en una región de entramado sustancialmente humano, pero en el que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena pesada difiere en la secuencia respecto a la CDR de cadena pesada del anticuerpo de ratón 3G8 correspondiente. Por ejemplo, en una realización, las CDR(S) difiere(n) de la secuencia de las CDR de 3G8 al menos por tener una o más sustituciones de CDR que en la técnica se ha demostrado que afectan a la unión de 3G8 a CD16A, como es sabido en la técnica o como se describe en las Tablas 3 y 4A-H. Las proteínas de unión a CD16 apropiadas pueden contener 0, 1, 2, 3 o 4, o más de estas sustituciones (y muchas veces tienen de 1 a 4 de estas sustituciones) y como opción, pueden tener también sustituciones adicionales.

TABLA 3. Sustituciones del dominio V_H

No.	Posición Kabat	Región	Sustituciones
1	2	FR1	Ile
2	5	FR1	Lys
3	10	FR1	Thr
4	30	FR1	Arg
5	34	CDR1	Val
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe o Tyr o Asp
8	54	CDR2	Asn
9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln o Lys o Ala o His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

TABLA 4A. Secuencias de V_H derivadas de V_H de 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VH	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VH	A	A	A	A	A	A	B
HxC	B	A	B	A	A	A	B
CxH	A	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VH-1	B	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-2	C	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-3	D	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-4	B	A	B	A	C	B	B
Hu3G8VH-5	B	A	B	A	C	A	B
Hu3G8VH-6	B	B	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-7	B	B	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-8	B	A	B	A	B	C	B
Hu3G8VH-9	B	A	B	B	B	B	B
Hu3G8VH-10	B	A	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-11	B	A	B	B	B	A	B

Hu3G8VH-12	B	A	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-13	B	A	B	D	B	A	B
Hu3G8VH-14	B	A	B	E	B	A	B
Hu3G8VH-15	B	A	B	A	D	A	B
Hu3G8VH-16	B	A	B	A	E	A	B
Hu3G8VH-17	B	A	B	A	F	A	B
Hu3G8VH-18	B	A	B	A	G	A	B
Hu3G8VH-19	B	A	B	A	C	C	B
Hu3G8VH-20	B	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-21	B	A	B	A	D	B	B
Hu3G8VH-22	B	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-23	B	B	B	C	E	C	B
Hu3G8VH-24	B	B	B	C	F	C	B
Hu3G8VH-25	B	B	B	C	G	C	B
Hu3G8VH-26	B	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-27	B	B	B	C	E	D	B
Hu3G8VH-28	B	B	B	C	F	D	B
Hu3G8VH-29	B	B	B	C	G	D	B
Hu3G8VH-30	B	B	B	C	C	D	B
Hu3G8VH-31	E	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-32	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-33	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-34	E	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-35	E	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-36	E	B	B	H	C	D	B
Hu3G8VH-37	E	B	B	H	E	C	B
Hu3G8VH-38	E	B	B	F	B	A	B
Hu3G8VH-39	E	B	B	I	B	A	B
Hu3G8VH-40	E	B	B	G	B	A	B
Hu3G8VH-41	E	B	B	J	B	A	B
Hu3G8VH-42	E	B	B	C	H	A	B
Hu3G8VH-43	E	B	B	C	H	C	B
Hu3G8VH-44	E	B	B	C	I	D	B
Hu3G8VH-45	E	B	B	C	J	D	B

* Las letras en la Tabla 4A se refieren a las secuencias en las Tablas 4 B-H

TABLA 4B: FR1

A	B	C	D	E		RESIDUO
Q	Q	Q	Q	Q		1
V	V	V	V	I		2
T	T	T	T	T		3
L	L	L	L	L		4
K	R	K	R	K		5
E	E	E	E	E		6

S	S	S	S	S		7
G	G	G	G	G		8
P	P	P	P	P		9
G	A	A	A	T		10
I	L	L	L	L		11
L	V	V	V	V		12
Q	K	K	K	K		13
P	P	P	P	P		14
S	T	T	T	T		15
Q	Q	Q	Q	Q		16
T	T	T	T	T		17
L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21
C	C	C	C	C		22
S	T	T	T	T		23
F	F	F	F	F		24
S	S	S	S	S		25
G	G	G	G	G		26
F	F	F	F	F		27
S	S	S	S	S		28
L	L	L	L	L		29
R	S	S	R	S		30
103	**104**	**105**	**106**	**107**		**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	Secuencia
103	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLR
104	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
105	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
106	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR
107	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLS

TABLA 4C: CDR1

A	B		RESIDUO
T	T		31
S	S		32
G	G		33
M	V		34
G	G		35
V	V		35A
G	G		35B
108	**109**		**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	Secuencia
108	TSGMGVG
109	TSGVGVG

TABLA 4D: FR2

A	B		RESIDUO
W	W		36
I	I		37
R	R		38
Q	Q		39
P	P		40
S	P		41
G	G		42
K	K		43
G	A		44
L	L		45
E	E		46
W	W		47
L	L		48
A	A		49
110	**111**		**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	Secuencia
110	WIRQPSGKGLEWLA
111	WIRQPPGKALEWLA

TABLA 4E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESIDUO
H	H	H	H	H	L	H	L	H	L	50
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	51
W	Y	W	Y	W	D	F	W	D	W	52
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	53
D	N	D	D	N	D	D	D	D	N	54
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	55
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	57
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	58
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	59
N	N	S	N	N	S	S	S	S	S	60
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	61
A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	62
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	63
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	64
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	65

112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	ID SEC NO:

ID SEC NO:	Secuencia
112	HIWWDDDKRYNPALKS
113	HIYWNDDKRYNPALKS
114	HIWWDDDKRYSPSLKS
115	HIYWDDDKRYNPALKS
116	HIWWNDDKRYNPALKS
117	LIDWDDDKRYSPSLKS
118	HIFWDDDKRYSPSLKS
119	LIWWDDDKRYSPSLKS
120	HIDWDDDKRYSPSLKS
121	LIWWNDDKRYSPSLKS

TABLA 4F: FR3

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESIDUO
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	66
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	67
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	68
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	69
S	S	S	S	S	S	S	T	T	T	70
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	71
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	72
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	73
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	74
S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	75
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	76
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	77
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	78
F	V	V	V	V	V	V	V	V	V	79
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	80
K	T	T	T	T	T	T	T	T	T	81
I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82
A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	82A
S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	82B
V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82C
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	83
T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	84
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	85
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	86
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	91

C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	92
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	93
Q	R	Q	T	K	A	H	R	H	Q	94
122	**123**	**124**	**125**	**126**	**127**	**128**	**129**	**130**	**131**	82 ID SEC NO:
132	**133**	**134**	**135**	**136**	**137**	**138**	**139**	**140**	**141**	82A ID SEC NO:
142	**143**	**144**	**145**	**146**	**147**	**148**	**149**	**150**	**151**	82B ID SEC NO:
152	**153**	**154**	**155**	**156**	**157**	**158**	**159**	**160**	**161**	82C ID SEC NO:

ID SEC NO:	Secuencia
122	RLTISKDTSSNQVFLKIDTADTATYYCAQ
123	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
124	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
125	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
126	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
127	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
128	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
129	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
130	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
131	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
132	RLTISKDTSSNQVFLKADTADTATYYCAQ
133	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
134	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
135	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAT
136	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAK
137	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAA
138	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
139	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
140	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
141	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
142	RLTISKDTSSNQVFLKSDTADTATYYCAQ
143	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
144	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
145	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAT
146	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAK
147	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAA
148	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
149	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
150	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
151	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
152	RLTISKDTSSNQVFLKVDTADTATYYCAQ
153	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
154	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ

ID SEC NO:	Secuencia
155	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
156	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
157	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
158	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
159	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
160	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
161	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ

TABLA 4G: CDR3

A	B	C	D	RESIDUO
I	I	I	I	95
N	N	N	N	96
P	P	P	P	97
A	A	A	A	98
W	W	Y	Y	99
F	F	F	F	100
A	D	A	D	101
Y	Y	Y	Y	102
162	**163**	**164**	**165**	**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	Secuencia
162	INPAWFAY
163	INPAWFDY
164	INPAYFAY
165	INPAYFDY

TABLA 4H: FR4

A	B		RESIDUO
W	W		103
G	G		104
Q	Q		105
G	G		106
T	T		107
L	L		108
V	V		109
T	T		110
V	V		111
S	S		112
A	S		113
166	**167**		**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	Secuencia
166	WGQGTLVTVSA
167	WGQGTLVTVSS

En una realización, la proteína de unión a CD16A puede contener una secuencia del dominio variable de cadena pesada que es igual que, o similar a, el dominio VH del constructo Hu3G8VH-1, cuya secuencia se proporciona en ID SEC NO: 68. Por ejemplo, la invención proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VH con una secuencia que: (1) difiere del dominio VH del constructo Hu3G8VH-1 (ID SEC NO: 68) en cero, una o más de una de las sustituciones de CDR establecidas en la Tabla 1; (2) difiere del dominio VH del constructo Hu3G8VH-1 en cero, una o más de una de las sustituciones de región de entramado como se establece en la Tabla 1; y (3) es idéntica en al menos aproximadamente el 80%, muchas veces idéntica en al menos alrededor del 90%, y en ocasiones idéntica en al menos aproximadamente el 95%, o incluso idéntica en al menos alrededor del 98% a la secuencia VH de Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes.

Los dominios VH a modo de ejemplo de las proteínas de unión a CD16 de la invención tienen la secuencia de 3G8VH, Hu3G8VH-5 y Hu3G8VH-22 (ID SEC NO: 79, ID SEC NO: 69 e ID SEC NO: 70, respectivamente). Las secuencias de nucleótidos a modo de ejemplo que codifican las secuencias de 3G8VH y Hu3G8VH-5 (ID SEC NO: 79 e ID SEC NO: 69, respectivamente) se proporcionan mediante la ID SEC NO: 80 e ID SEC NO: 81, respectivamente.

El dominio VH puede tener una secuencia que difiere de la del constructo Hu3G8VH-1 (ID SEC NO: 68) en al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis de las sustituciones que se muestran en la Tabla 3. Se considera que estas sustituciones dan como resultado afinidad aumentada para CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a humanos. En ciertas realizaciones, el grado de identidad de la secuencia con el dominio VH del constructo Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes es al menos alrededor del 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 98%.

Como ilustración y no como limitación, las secuencias de diversos dominios VH de la proteína de unión a CD16A se muestran en la Tabla 4. Las cadenas pesadas que contienen estas secuencias fusionadas a una región constante de Cγ1 humana se coexpresaron con la cadena ligera del constructo hu3G8VL-1 (se describe más adelante) para formar los anticuerpos tetraméricos, y la unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VH de hu3G8VH-1. Los constructos en los que el dominio VH tiene una secuencia de hu3G8VH-1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 14. 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44 y 45 mostraron elevada afinidad de unión, mostrando unión intermedia los dominios VH hu3G8VH-6 y -40. Se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables las proteínas de unión a CD16A que comprende los dominios VH de los constructos hu3G8VH-5 y hu3G8VH-22 (ID SEC NO: 69 e ID SEC NO: 70, respectivamente).

5.1.2.2 Región VL

Se realizaron estudios similares para identificar las secuencias del dominio variable de cadena ligera con propiedades de unión favorables. En un aspecto, la invención aporta una proteína de unión a CD16A que contiene un dominio variable de cadena ligera en el que al menos una CDR (y por lo regular las tres CDR) tienen la secuencia de una CDR (y más comúnmente las tres CDR) de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para el que las partes restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de y similares sustancialmente a, la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de un anticuerpo 3G8 humanizado que contiene las CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en una región de entramado sustancialmente humana, pero en el que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena ligera difiere en secuencia respecto a la CDR de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. En una realización, la(s) CDR difiere(n) de la secuencia de 3G8 teniendo al menos una o más sustituciones de aminoácidos en una CDR, como pueden ser, una o más sustituciones como se muestra en la Tabla 2 (por ejemplo, arginina en la posición 24 de la CDR1; serina en la posición 25 de la CDR1; tirosina en la posición 32 de la CDR1; leucina en la posición 33 de la CDR1; ácido aspártico, triptófano o serina en la posición 50 de la CDR2; serina en la posición 53 de la CDR2; alanina o glutamina en la posición 55 de la CDR2; treonina en la posición 56 de la CDR2; serina en la posición 93 de la CDR3; y/o treonina en la posición 94 de la CDR3). En algunas realizaciones, el dominio variable puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, o más de estas sustituciones (y muchas veces tienen desde 1 hasta 4 de estas sustituciones) y como opción pueden tener también otras sustituciones.

En una realización, la proteína de unión a CD16A apropiada puede contener una secuencia del dominio variable de cadena ligera que es igual que o similar al dominio VL del constructo Hu3G8VL-1 (ID SEC NO: 71), cuya secuencia se proporciona en la Tabla 6. Por ejemplo, la invención proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VL con una secuencia que: (1) difiere del dominio VL del constructo Hu3G8VL-1 (ID SEC NO: 71) en cero, una o más de las sustituciones de CDR que se establecen en la Tabla 5; (2) difiere del dominio VL del constructo Hu3G8VL-1 en cero, una o más de las sustituciones de región de entramado que se establecen en la Tabla 5; y (3) es al menos idéntica en aproximadamente el 80%, muchas veces al menos idéntica en alrededor del 90%, y en ocasiones al menos idéntica en alrededor del 95%, o incluso al menos idéntica en aproximadamente el 98% a la secuencia VL del constructo Hu3G8VL-1 (ID SEC NO: 71) en las posiciones restantes.

TABLA 5. Sustituciones del dominio V_L de 3G8

No.	Posición Kabat	Región	Sustituciones
1	24	CDR1	Arg
2	25	CDR1	Ser
3	32	CDR1	Tyr
4	33	CDR1	Leu
5	50	CDR2	Asp o Trp o Ser
6	51	CDR2	Ala
7	53	CDR2	Ser
8	55	CDR2	Ala o Gln
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

TABLA 6. Secuencias de V_L derivadas de la V_L de 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Hu3G8VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-3	B	C	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-8	B	A	A	B	B	A	B
Hu3G8VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3G8VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3G8VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3G8VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3G8VL-14	B	A	A	A	B	B	B
Hu3G8VL-15	B	A	A	A	B	C	B
Hu3G8VL-16	B	A	A	A	B	D	B
Hu3G8VL-17	B	A	A	A	B	E	B
Hu3G8VL-18	B	B	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-19	B	B	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-22	B	C	A	D	B	D	B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VL-23	B	C	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-25	B	D	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3G8VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3G8VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3G8VL-35	B	B	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-39	B	C	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-44	B	A	A	K	B	A	B

* Las letras de la Tabla 6A se refieren a las secuencias de las Tablas 6B-H.

TABLA 6B: FR1

A	B	RESIDUO
D	D	1
T	I	2
V	V	3
L	M	4
T	T	5
Q	Q	6
S	S	7
P	P	8
A	D	9
S	S	10
L	L	11
A	A	12
V	V	13
S	S	14
L	L	15
G	G	16
Q	E	17
R	R	18
A	A	19

A	B	RESIDUO
T	T	20
I	I	21
S	N	22
C	C	23
168	**169**	**ID SEC NO:**

NO.	**Secuencia**
168	DTVLTQSPASLAVSL
169	DIVMTQSPDSLAVSL

TABLA 6C: CDR1

A	B	C	D	E	F	G	RESIDUO
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
170	**171**	**172**	**173**	**174**	**175**	**176**	**27 ID SEC NO**
177	**178**	**179**	**180**	**181**	**182**	**183**	**27A ID SEC NO**
184	**185**	**186**	**187**	**188**	**189**	**190**	**27B ID SEC NO**
191	**192**	**193**	**194**	**195**	**196**	**197**	**27C ID SEC NO**
198	**199**	**200**	**201**	**202**	**203**	**204**	**27D ID SEC NO**

ID SEC NO.	**Secuencia**
170	KASQDGDSFMN
171	RASQDGDSFMN
172	KSSQDGDSFMN
173	KASQDGDSYMN

ID SEC NO:	Secuencia
174	KASQDGDSFLN
175	KASQDGDSFMA
176	KASQDGDSYLA
177	KASSDGDSFMN
178	RASSDGDSFMN
179	KSSSDGDSFMN
180	KASSDGDSYMN
181	KASSDGDSFLN
182	KASSDGDSFMA
183	KASSDGDSYLA
184	KASVDGDSFMN
185	RASVDGDSFMN
186	KSSVDGDSFMN
187	KASVDGDSYMN
188	KASVDGDSFLN
189	KASVDGDSFMA
190	KASVDGDSYLA
191	KASDDGDSFMN
192	RASDDGDSFMN
193	KSSDDGDSFMN
194	KASDDGDSYMN
195	KASDDGDSFLN
196	KASDDGDSFMA
197	KASDDGDSYLA
198	KASFDGDSFMN
199	RASFDGDSFMN
200	KSSFDGDSFMN
201	KASFDGDSYMN
202	KASFDGDSFLN
203	KASFDGDSFMA
204	KASFDGDSYLA

TABLA 6D: FR2

A	RESIDUO
W	35
Y	36
Q	37
Q	38
K	39
P	40
G	41
Q	42
P	43
P	44

A	RESIDUO
K	45
L	46
L	47
I	48
Y	49
205	**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	**Secuencia**
205	WYQQKAPGQPPKLLIY

TABLA 6E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESIDUO
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
206	**207**	**208**	**209**	**210**	**211**	**212**	**213**	**214**	**215**	**216**	**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	**Secuencia**
206	TTSNLES
207	DASNLES
208	WASNLES
209	TTSNLET
210	DASNLET
211	DASNLAT
212	SASNLQS
213	STSNLES
214	STSNLQS
215	TTSNLQS
216	TTSSLQS

TABLA 6F: FR3

A	B	RESIDUO
G	G	57
I	V	58
P	P	59

A	B	RESIDUO
A	D	60
R	R	61
F	F	62
S	S	63
A	G	64
S	S	65
G	G	66
S	S	67
G	G	68
T	T	69
D	D	70
F	F	71
T	T	72
L	L	73
N	T	74
I	I	75
H	S	76
P	S	77
V	L	78
E	Q	79
E	A	80
E	E	81
D	D	82
T	V	83
A	A	84
T	V	85
Y	Y	86
Y	Y	87
C	C	88
217	**218**	**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	**Secuencia**
217	GIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC
218	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

TABLA 6G: CDR3

A	B	C	D	E	RESIDUO
Q	Q	Q	Q	Q	89
Q	Q	Q	Q	Q	90
S	S	S	S	S	91
N	Y	Y	N	N	92
E	S	E	S	E	93
D	T	D	D	T	94

P	P	P	P	P	95
Y	Y	Y	Y	Y	96
T	T	T	T	T	97
219	**220**	**221**	**222**	**223**	**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	Secuencia
219	QQSNEDPYT
220	QQSYSTPYT
221	QQSYEDPYT
222	QQSNSDPYT
223	QQSNETPYT

TABLA 6H : FR4

A	B	RESIDUO
F	F	98
G	G	99
G	Q	100
G	G	101
T	T	102
K	K	103
L	L	104
E	E	105
I	I	106
K	K	107
224	**225**	**ID SEC NO:**

ID SEC NO:	Secuencia
224	FGGGTKLEIK
225	FGQGTKLEIK

Los dominios VL a modo de ejemplo de las proteínas de unión a CD16 de la invención tienen la secuencia de 3G8VL, Hu3G8VL-1 o Hu3G8VL-43, (ID SEC NO: 82, ID SEC NO: 71 e ID SEC NO: 72, respectivamente) como se muestra en las Tablas 5 y 6. Las secuencias de nucleótidos a modo de ejemplo que codifican 3G8VL (ID SEC NO: 82) y Hu3G8VL-1 (ID SEC NO: 71) se proporcionan en la ID SEC NO: 83 e ID SEC NO: 84, respectivamente.

El dominio VL puede tener una secuencia que difiera de la del constructo Hu3G8VL-1 (ID SEC NO: 71) en cero, una, al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, o al menos 9 de las sustituciones que se muestran en la Tabla 2. Se considera que estas sustituciones producen una afinidad aumentada para CD16A y/o disminuyen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a humanos. En ciertas realizaciones, el grado de identidad de las secuencias en las posiciones restantes es de al menos alrededor del 80%, de al menos alrededor del 90%, de al menos alrededor del 95% o de al menos alrededor del 98%.

Como ilustración y no como limitación, las secuencias de varios dominios VL de las proteínas de unión a CD16A se muestran en la Tabla 6. Las cadenas ligeras que comprenden estas secuencias fusionadas a un dominio constante Cκ humano se coexpresaron con una cadena pesada de Hu3G8VH (antes descrita) para formar anticuerpos tetraméricos, y la unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VL del constructo Hu3G8VL-1 (ID SEC NO: 71). Los constructos en los que el dominio VL tiene una secuencia de hu3G8VL-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 42 mostraron alta afinidad de unión y hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 y 41 mostraron

unión intermedia. Las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VL de los constructos hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 y hu3G8VL-43 se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables (ID SEC NO: 71, ID SEC NO: 73 e ID SEC NO: 72, respectivamente).

5.1.2.2.1 Combinaciones de los dominios VL y/o VH

Como se sabe en la técnica y se describe en otra parte del presente documento, las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina pueden expresarse por métodos recombinantes en condiciones en las que estas se asocian para producir un diacuerpo, o también pueden combinarse *in vitro*. De este modo, se apreciará que un dominio VL derivado de 3G8 descrito en el presente documento puede combinarse con un dominio VH derivado de 3G8 descrito en el presente documento para producir un diacuerpo de unión a CD16A, y se consideran todas estas combinaciones.

Como ilustración y no como limitación, los ejemplos de los diacuerpos de unión a CD16A son aquellos que comprenden al menos un dominio VH y al menos un dominio VL, donde el dominio VH procede de los constructos hu3G8VH-1, hu3G8VH-22 o hu3G8VH-5 (ID SEC NO: 68, ID SEC NO: 70 e ID SEC NO: 69, respectivamente) y el dominio VL procede de los constructos hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (ID SEC NO: 71, ID SEC NO: 73 e ID SEC NO: 41, respectivamente). En particular, los anticuerpos humanizados que comprenden los constructos hu3G8VH-22 (ID SEC NO: 22) y, hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (ID SEC NO: 71, ID SEC NO: 70 e ID SEC NO: 72, respectivamente) cualesquiera o hu3G8VH-5 (ID SEC NO: 69) y hu3G8VL-1 (ID SEC NO: 71) tienen propiedades favorables.

Los expertos en la técnica se darán cuenta que las secuencias de los dominios VL y VH descritos en el presente documento además pueden modificarse utilizando los métodos conocidos en la técnica, como pueden ser maduración por afinidad (véase Schier *et al*. (1996) "*Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site*", J. Mol. Biol. 263:551-567; Daugherty *et al*. (1998) "*Antibody Affinity Maturation Using Bacterial Surface Display*", Protein Eng. 11: 825-832; Boder *et al*. (1997) "*Yeast Surface Display For Screening Combinatorial Polypeptide Libraries*", Nat. Biotechnol. 15:553-557; Boder *et al*. (2000) "*Directed Evolution Of Antibody Fragments With Monovalent Femtomolar Antigen-Binding Affinity",* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97: 10701 -10705; Hudson *et al*. (2003) "*Engineered Antibodies*", Nature Medicine 9: 129-39). Por ejemplo, las proteínas de unión a CD16A pueden modificarse empleando técnicas de maduración por afinidad con el fin de identificar proteínas con afinidad aumentada para CD16A y/o afinidad disminuida para CD16B.

Una proteína de unión a CD16 a modo de ejemplo es el anticuerpo 3G8 de ratón. La secuencia de aminoácidos que comprende los dominios VH y VL del anticuerpo 3G8 humanizado se describe en las figuras 2, 9, 14 y se establecen en las ID SEC NO: 9, ID SEC NO: 11, ID SEC NO: 12, ID SEC NO: 14, ID SEC NO: 15, ID SEC NO: 16, ID SEC NO: 18, ID SEC NO: 19, ID SEC NO: 20, ID SEC NO: 21, ID SEC NO: 22, ID SEC NO: 68, ID SEC NO: 69, ID SEC NO: 70, ID SEC NO: 71 e ID SEC NO: 72.

5.2 DIACUERPOS QUE CONTIENEN REGIONES Fc O PARTES DE ESTAS

La invención abarca las moléculas de diacuerpo que contienen dominios Fc o partes de estos (por ejemplo, un dominio CH2 o CH3). En ciertas realizaciones, el dominio Fc, o parte(s) de éste, contienen uno o más dominios constantes de la región Fc de IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo, CH2 o CH3). En otras realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden un dominio Fc o parte de este, en donde el dominio Fc o parte de este comprende al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución) respecto a un dominio Fc de tipo natural equivalente o parte de éste. Los dominios Fc variantes son bien conocidos en la técnica y se utilizan principalmente para alterar el fenotipo del anticuerpo que comprende tal dominio Fc variante tal como se evalúa mediante ensayos de la actividad de unión o la función efectora bien conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de ELISA, SPR, o ADCC. Tales dominios Fc variantes, o partes de estos, tienen uso en la presente invención confiriendo o modificando la función efectora que presenta una molécula de diacuerpo de la invención que contiene un dominio Fc (o parte de este) tal como se determina en ensayos de la función, por ejemplo, en un ensayo dependiente de células NK o dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas como alteradoras que alteran la función efectora se describen en la solicitud internacional WO 04/063351, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, las solicitudes provisionales estadounidenses 60/626.510, presentada el 10 de noviembre de 2004, 60/636.663, presentada el 15 de noviembre de 2004, y 60/781.564, presentada el 10 de marzo de 2006, y las solicitudes de patente estadounidenses 11/271.140, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787, presentada el 15 de diciembre de 2005, las solicitudes concurrentes de los Inventores.

En otras realizaciones, la invención abarca el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, como pueden ser aquellas que se describen en los documentos Duncan *et al*. (1 88) "*Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG*", Nature 332:563-564; Lund *et al*. (1991) "*Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG",* J. Immunol. 147:2657-2662; Lund *et al*. (1992) "*Multiple Binding Sites On The CHI Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII*", Mol. Immunol. 29:53-59;

Alegre *et al*. (1994) "*A Non-Activating "Humanized" Anti-CDS Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo*", Transplantation 57: 1537-1543; Hutchins *et al*. (1995) "*Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H*", Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92: 11980-11984; Jefferis *et al*. (1995) "*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation*", Immunol. Lett. 44: 111-117; Lund *et al*. (1995) "*Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors*", FASEB J. 9: 115-119; Jefferis *et al*. (1996) "*Modulation OfFc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions",* Immunol. Lett. 54: 101 -104; Lund *et al*. (1996) "*Multiple Interactions Oflgg With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains*", J. Immunol. 157:4963-4969; Armour *et al*. (1999) "*Recombinant Human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities",* Eur. J. Immunol. 29:2613-2624; Idusogie *et al*. (2000) "*Mapping Of The C1Q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG1 Fc*", J. Immunol. 164:4178-4184; Reddy *et al*. (2000) "*Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4",* J. Immunol. 164:1925-1933; Xu *et al*. (2000) "*In vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies",* Cell. Immunol. 200: 16-26; Idusogie *et al*. (2001) "*Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement*", J. Immunol. 166:2571-2575; Shields *et al*. (2001) "*High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgGl For Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, And FcRn And Design Of IgGl Variants With Improved Binding To The Fc gamma R*", J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Jefferis *et al*. (2002) "*Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR: Current Models*", Immunol. Lett. 82:57-65; Presta *et al*. (2002) "*Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function",* Biochem. Soc. Trans. 30:487-490); US 5.624.821; US 5.885.573; US 6.194.551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572.

En ciertas realizaciones, dichas una o más modificaciones a los aminoácidos de la región Fc disminuyen la afinidad y la avidez de la región Fc y, de este modo, la molécula de diacuerpo de la invención, para uno o más receptores FcγR. En una realización específica, la invención abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o parte de ésta, en donde tal región Fc variante contiene al menos una modificación de aminoácido respecto a una región Fc de tipo natural, región Fc variante que solo se une a un FcγR, en donde tal FcγR es FcγRIIIA. En otra realización específica, la invención abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o parte de ésta, en donde la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido respecto a la región Fc de tipo natural, región Fc variante que solo se une a un FcγR, en donde tal FcγR es FcγRIIA. En otra realización específica, la invención abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o una parte de esta, en donde tal región Fc variante contiene al menos una modificación de aminoácido respecto a la región Fc de tipo natural, región Fc variante que solo se une a un FcγR, en donde tal FcγR es FcγRIIB. En ciertas realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden un dominio Fc variante, en donde la variante confiere o media en la actividad aumentada de ADCC y/o una unión aumentada a FcγRIIA (CD32A), respecto a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo natural, medido utilizando los métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en el presente documento. En realizaciones alternativas, la invención abarca moléculas que contienen un dominio Fc variante, en donde la variante confiere o media en la actividad disminuida de ADCC (u otra función efectora) y/o unión aumentada a FcγRIIB (CD32B), respecto a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo natural, lo que se mide utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica y descritos en el presente documento.

La invención también abarca el uso de un dominio Fc que contiene dominios o regiones procedentes de dos o más isotipos de IgG. Como se sabe en la técnica, la modificación de aminoácidos de la región Fc puede afectar profundamente a la función efectora y/o la actividad de unión mediada por el fragmento Fc. Sin embargo, estas alteraciones en las características funcionales además pueden refinarse y/o manipularse por ingeniería cuando se practican en el contexto de los isotipos IgG elegidos. Del mismo modo, las características naturales del segmento Fc del isotipo pueden manipularse mediante una o más modificaciones de aminoácidos. Los múltiples isotipos de IgG (es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentan diferentes propiedades físicas y funcionales incluyendo la semivida en suero, fijación del complemento, afinidades de unión a FcγR y actividades de función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC) debido a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios bisagra y/o Fc. En ciertas realizaciones, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG se seleccionan de manera independiente basándose en sus actividades de unión y/o función efectora respectivas, diferentes con el fin de diseñar un diacuerpo con características deseadas. En la mayoría de las realizaciones, las modificaciones de aminoácidos y las regiones bisagra/Fc de IgG se han sometido a ensayo por separado para determinar su actividad de unión y/o función efectora como se describe en el presente documento o como se sabe en la técnica en el contexto de una IgG1. En ciertas realizaciones, tal modificación de aminoácidos y región bisagra/Fc de la IgG presentan funcionalidad similares, por ejemplo, afinidad aumentada para FcγRIIA, cuando se someten a ensayo por separado para determinar la unión a FcγR o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina). La combinación de tal modificación de aminoácidos y la región Fc de la IgG seleccionada entonces actúan de manera aditiva o, más preferiblemente, de manera sinérgica para modificar la funcionalidad de la molécula de diacuerpo de la invención, respecto a una molécula de diacuerpo de la invención que comprende una región Fc de tipo natural. En otras realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y la región Fc de la IgG presentan funcionalidades contrarias, por ejemplo, afinidad aumentada y disminuida, respectivamente, para FcγRIIA, cuando se someten a ensayo por separado para determinar la actividad de unión a

FcγR y/o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina) que comprende una región Fc de tipo natural como se describe en el presente documento o como se sabe en la técnica; la combinación de tal modificación de aminoácidos y región de la IgG seleccionadas "contrarias" entonces actúan para atemperar o disminuir a elección una funcionalidad específica en el diacuerpo de la invención respecto a un diacuerpo de la invención que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo natural del mismo isotipo. Como alternativa, la invención abarca regiones Fc variantes que contienen combinaciones de modificaciones de aminoácidos conocidas en la técnica y regiones IgG seleccionadas que presentan propiedades novedosas, propiedades que no fueron detectables cuando tales modificaciones y/o regiones se sometieron a ensayo de manera independiente como se describe en el presente documento.

Las características funcionales de los múltiples isotipos de IgG, y los dominios de estos, son bien conocidas en la técnica. La secuencia de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se presenta en las figuras 1A-1B. La selección y/o combinaciones de dos o más dominios procedentes de isotipos de IgG específicos que se utilizan en los métodos de la invención pueden basarse en cualquier parámetro conocido de los isotipos precursores, como puede ser la afinidad para FcγR (Tabla 7; Flesch *et al*. (2000) "*Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G",* J. Clin. Lab. Anal. 14: 141-156; Chappel *et al*. (1993) "*Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody",* J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel *et al*. (1991) "*Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgGl/IgGl Hybrid And Point-Mutated Antibodies",* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040). Por ejemplo, el uso de regiones o dominios derivados de los isotipos de IgG que presentan unión limitada o no se unen a FcγRIIB, por ejemplo, IgG2 o IgG4, pueden encontrar uso particular cuando se desea que se manipule por ingeniería un diacuerpo para llevar al máximo la unión a un receptor activador y llevar al mínimo la unión a un receptor inhibidor. Del mismo modo, el uso de regiones o dominios Fc procedentes de isotipos de IgG de los que se sabe que se unen preferentemente a C1q o FcγRIIIA, por ejemplo, IgG3 (Brüggemann *et al*. (1987) "*Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies",* J. Exp. Med. 166: 1351-1361), pueden combinarse con las modificaciones de aminoácidos de Fc conocidas en la técnica para mejorar la ADCC, para manipular por ingeniería una molécula de diacuerpo de modo que se lleve al máximo la actividad de función efectora, por ejemplo, la activación del complemento o ADCC.

TABLA 7. Características generales de la unión de IgG a FcγR, adaptado de Flesch y Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14: 141-156

Receptor	Afinidad estimada para IgG (M^{-1})	Afinidad relativa
FcγRI	$10^8 – 10^9$	IgG3>IgG1>>IgG4 Sin unión: IgG2
FcγRIIA $R^{131\ A}$	$< 10^7$	IgG3>IgG1 Sin unión: IgG2, IgG4
FcγRIIA $H^{131\ A}$	$< 10^7$	IgG3>IgG1>IgG2 Sin unión: IgG4
FcγRIIB [A]	$< 10^7$	IgG3>IgG1>IgG4 Sin unión: IgG2
FcγRIII	$< 10^7$	IgG3=IgG1 Sin unión: IgG2, IgG4

[A] se une solo a IgG complejada

5.3 CONJUGADOS MOLECULARES

Las moléculas de diacuerpo de la invención se pueden fusionar por métodos recombinantes o conjugar por métodos químicos (como pueden ser las conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o parte de este, preferiblemente de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea directa, puede producirse mediante secuencias ligadoras.

Además, las moléculas de diacuerpo de la invención (es decir, los polipéptidos) pueden conjugarse a un agente terapéutico o resto de fármaco que modifique una respuesta biológica determinada. Como alternativa a la conjugación directa, debido a los múltiples sitios de unión a epítopo en las moléculas de diacuerpo multivalentes, por ejemplo, tetravalentes, de la invención, al menos una región de unión del diacuerpo puede estar diseñada para unirse al agente terapéutico o resto de fármaco deseada sin afectar a la unión al diacuerpo.

Los agentes terapéuticos o restos de fármacos no son considerados como limitados a los agentes terapéuticos químicos convencionales. Por ejemplo, un resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que presente una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, PE-40), o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antiviral de fitolaca, una proteína como puede ser el factor de necrosis tumoral, interferones incluyendo pero sin limitarse a, interferón α (IFN-α), interferón β (IFN-β), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF-α, TNF-β, AIM como se describe en la publicación del PCT n.º WO 97/33899), AIM II (véase, publicación PCT n.º WO 97/34911), ligando Fas y VEGI (publicación PCT n.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica incluyendo por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrofagos ("GM-CSF"), y el factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulador de colonias de macrófagos, ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, la hormona de crecimiento ("GH"); proteasas o ribonucleasas.

Las moléculas de diacuerpo de la invención (es decir, los polipéptidos) pueden fusionarse a secuencias de marcadores, como puede ser un péptido para facilitar la purificación. En las realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos de marcador es un péptido de hexa-histidina, como puede ser la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de que están a la disposición en el comercio. Como se describe en Gentz *et al*. (1989 "*Bioassay For Trans-Activation Using Purified Human Immunodeficiency Virus TAT-Encoded Protein: Trans-Activation Requires mRNA Synthesis*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, por ejemplo, hexa-histidina permite llevar a cabo la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina del virus influenza (Wilson *et al*. (1984) "*The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein*", Cell, 37:767-778) y la etiqueta "flag" (Knappik *et al*. (1994) "*An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments*", Biotechniques, 17(4):754-761).

Otras proteínas de fusión pueden ser generadas mediante las técnicas de intercambio de genes, intercambio de motivos, intercambio de exones y/o intercambio de codones (conocidos de manera colectiva como "intercambio de ADN"). El intercambio de ADN puede emplearse para alterar las actividades de las moléculas de la invención (por ejemplo, los sitios de unión a epítopo con mayores afinidades y menores velocidades de disociación). Véanse, en general, las patentes estadounidenses n.^{os} 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten *et al*. (1997) "*Applications Of ADN Shuffling To Pharmaceuticals And Vaccines",* Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-733; Harayama (1998) "*Artificial Evolution By ADN Shuffling",* Trends Biotechnol. 16:76-82; Hansson *et al*. (1999) "*Evolution Of Differential Substrate Specificities In Mu Class Glutathione Transferases Probed By ADN Shuffling",* J. Mol. Biol. 287:265-276; y Lorenzo *et al*. (1998) "*PCR-Based Method For The Introduction Of Mutations In Genes Cloned And Expressed In Vaccinia Virus",* BioTechniques 24:308-313. Las moléculas de diacuerpo de la invención, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención, además se pueden alterar para que sean sometidas a una mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos antes de la recombinación. Una o más partes de un polinucleótido que codifique una molécula de la invención, pueden ser recombinadas con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La presente invención también abarca moléculas de diacuerpo de la invención conjugadas a o que reconocen de manera inmunoespecífica un agente diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para el que se desea una semivida en suero aumentada/disminuida y/o dirigida a un subconjunto particular de células. Las moléculas de la invención pueden utilizarse en métodos de diagnóstico para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento analítico clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un determinado régimen de tratamiento. La detección se puede facilitar acoplando las moléculas de la invención a una sustancia detectable o mediante las moléculas que reconocen de manera inmunoespecífica la sustancia detectable. Los ejemplos de las sustancias detectables pueden ser diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a las moléculas de la invención o indirectamente mediante un producto intermedio (incluyendo por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) empleando técnicas conocidas, o la molécula puede reconocer de manera inmunoespecífica la sustancia detectable: la unión inmunoespecífica a tal sustancia. Véase, por ejemplo, patente estadounidense n.º 4.741.900 para revisar los iones metálicos que pueden conjugarse a los anticuerpos para utilizarlos como agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Tales métodos de diagnóstico y detección pueden llevarse a cabo diseñando las moléculas para reconocer de manera inmunoespecífica la sustancia detectable o mediante el acoplamiento de las moléculas de la invención a sustancias detectables incluyendo pero sin limitarse a, diversas enzimas, incluyendo, pero sin limitarse a, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos incluyendo pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes incluyendo pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente incluyendo pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes

incluyendo pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina y aequorina; material radiactivo incluyendo pero sin limitarse a, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromio (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd, ^{159}Gd), galio (^{68}Ga, ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In), yodo (^{131}I, ^{125}I, ^{1233}I, ^{121}I), lantano (,^{40}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re, ^{1888}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), estaño (^{113}Sn, ^{117}Sn), tritio (^{3}H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb, ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), zinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Las moléculas de diacuerpo de la invención pueden reconocer de manera inmunoespecífica o conjugarse a un resto terapéutico, como puede ser una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Los agentes citotóxicos o citotoxinas pueden ser cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos pueden ser paclitaxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Más aún, una molécula de diacuerpo de la invención puede conjugarse o puede estar diseñada para reconocer de manera inmunoespecífica restos terapéuticos como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase lo anterior para consultar los ejemplos de los materiales radiactivos). En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"'-tetraacético (DOTA) que puede unirse al polipéptido mediante una molécula ligadora. Tales moléculas ligadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo *et al*. (1998) "*Comparison Of 1,4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-N,N'.N",N"'-Tetraacetic Acid (DOTA)-Peptide-ChL6, A Novel Immunoconjugate With Catabolizable Linker, To 2-Iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl]-DOTA-ChL6 In Breast Cancer Xenografts* "Clin. Cancer Res. 4:2483-2490; Peterson *et al*. (1999) "*Enzymatic Cleavage Of Peptide-Linked Radiolahels From Immunoconjugates*" Bioconjug. Chem. 10:553-; y Zimmerman *et al*, (1999) "*A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake And Biodistributions Of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma mAb chCE7 F(ab')2 Fragments*", Nucl. Med. Biol. 26:943-950.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos a los polipéptidos, así como por ejemplo, a los dominios Fc, son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon *et al* "*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al*. (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al*, "*Antibodies For Drug Delivery*", en Controlled Drug Delivery (2ª ed.), Robinson *et al*. (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al*. (eds.), 1985, págs. 475-506); "*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy"*, en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al*. (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al*. (1982) "*The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates*" Immunol. Rev., 62: 119-158.

Las moléculas de diacuerpo de la invención pueden administrarse con o sin un resto terapéutico conjugado a éstas, pueden administrarse solas o combinadas con factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s) para su uso como tratamiento terapéutico. Cuando se administran solas, al menos un epítopo de una molécula de diacuerpo multivalente, por ejemplo, tetravalente, puede estar diseñado para reconocer de manera inmunoespecífica un agente terapéutico, por ejemplo, factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s), que puede administrarse de manera concurrente o posterior a la molécula de la invención. De este modo, la molécula de diacuerpo puede elegir específicamente el agente terapéutico de manera similar a la conjugación directa. De otro modo, una molécula de la invención puede conjugarse a un anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe por Segal en la patente estadounidense n.º 4.676.980. Las moléculas de diacuerpo de la invención pueden también unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o la purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden caracterizarse en diversas formas. En particular, las moléculas de la invención pueden someterse a ensayo para determinar la capacidad para unirse de manera inmunoespecífica a un antígeno, por ejemplo, FcRIIIA o FcRIIB, o, cuando la molécula comprende un dominio Fc (o una parte de éste) para determinar la capacidad para presentar interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica

de un dominio Fc (o parte de éste) a un FcγR. Un ensayo como este puede realizarse en disolución (por ejemplo, Houghten (1992) "*The Use Of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries For The Identification Of Bioactive Peptides*", BioTechniques, 13:412-421), en perlas (Lam (1991) "*A New Type Of Synthetic Peptide Library For Identifying Ligand-Binding Activity*", Nature, 354:82-84, en chips (Fodor (1993) "*Multiplexed Biochemical Assays With Biological Chips*" Nature, 364:555-556), en bacterias (patente estadounidense n.º 5.223.409), en esporas (patentes estadounidenses n.os 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull *et al*. (1992) "*Screening For Receptor Ligands Using Large Libraries Of Peptides Linked To The C Terminus Of The Lac Repressor",* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1865-1869) o en fagos (Scott *et al*. (1990) "*Searching For Peptide Ligands With An Epitope Library",* Science, 249:386-390; Devlin (1990) "*Random Peptide Libraries: A Source Of Specific Protein Binding Molecules",* Science, 249:404-406; Cwirla *et al*. (1990) "*Peptides On Phage: A Vast Library Of Peptides For Identifying Ligands*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382; y Felici (1991) "*Selection Of Antibody Ligands From A Large Library Of Oligopeptides Expressed On A Multivalent Exposition Vector*", J. Mol. Biol., 222:301-310). Las moléculas que hayan sido identificadas para unirse de manera inmunoespecífica a un antígeno, por ejemplo, FcγRIIIA, luego pueden someterse a ensayo para determinar su especificidad y afinidad para el antígeno.

Las moléculas de la invención que hayan sido manipuladas por ingeniería para que comprendan múltiples dominios de unión a epítopo pueden someterse a ensayo para la unión inmunoespecífica a uno o más antígenos (por ejemplo, antígeno de cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, FcγR)) o, cuando las moléculas contienen un dominio Fc (o parte de éste), para interacciones Fc-FcγR mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden utilizarse para analizar la unión inmunoespecífica, reactividad cruzada e interacciones Fc-FcγR incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos utilizando técnicas como el análisis de inmunotranferencia de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente de enzimas ligadas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar solo algunos. Estos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

La afinidad de unión y la constante de disociación (*off-rate*) de la interacción del dominio de unión a antígeno o la interacción Fc-FcγR pueden determinarse con ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que consiste en la incubación del antígeno marcado, como puede ser FcγR tetramérico (por ejemplo, ^{3}H o ^{125}I, véase la sección 5.4.1) con una molécula de interés (por ejemplo, las moléculas de la presente invención que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo en presencia de cantidades crecientes del epítopo no marcado, como puede ser el FcγR tetramérico (véase la sección 5.4.1), y la detección de la molécula unida al antígeno marcado. La afinidad de la molécula de la presente invención para un antígeno y las constantes de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación mediante el análisis de Scatchard.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención para un antígeno o FcγR pueden determinarse inicialmente empleando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para interacciones antígeno-dominio de unión o Fc-FcγR, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos de immunoprecipitación. Preferiblemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención también se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR, como se describe en la sección 5.4.2. En realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (como pueden ser los descritos y comentados en el presente documento) como las de los ensayos *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye las moléculas de la invención que no presentan el fenotipo deseado en ensayos *in vitro* pero presentan el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, para examinar e identificar moléculas que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, dominios Fc (o partes de estos) se realizan ensayos basados en la función, preferiblemente de una manera de alto rendimiento. Los ensayos basados en la función pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediada por FcγR, como pueden ser aquellas que se describen en el presente documento en las secciones 5.4.2 y 5.4.3. Los ejemplos no limitativos de las funciones de células efectoras que pueden utilizarse de acuerdo con los métodos de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a células, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento.

En una realización preferida, se utiliza el análisis cinético BIAcore para determinar las constantes de afinidad y disociación de la unión de las moléculas de la presente invención a un antígeno y/o a FcγR. El análisis cinético BIAcore consiste en analizar la unión y disociación de un antígeno o FcγR a partir de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que contienen dominios de unión a epítopo o dominios Fc (o partes de éstos), respectivamente) en su superficie. El análisis BIAcore se describe en la sección 5.4.3.

Preferiblemente, el análisis para la selección de células activadas por fluorescencia (FACS), utilizando cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, se utiliza para el ensayo inmunológico o funcional para caracterizar moléculas de la invención. Los citómetros de flujo son capaces de examinar rápidamente una gran cantidad de células individuales que hayan sido unidas, por ejemplo, opsonizadas, por las moléculas de la invención (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro *et al*. (1995) Practical Flow Cytometry). Además, los parámetros específicos que se utilizan para optimizar el comportamiento del diacuerpo incluyen, pero no se limitan a, la concentración del antígeno (es decir, el complejo tetramérico FcγR, véase la sección 5.4.1), el tiempo de la competencia cinética o condiciones rigurosas de FACS, cada una de las que puede variar con el fin de seleccionar las moléculas de diacuerpo que contengan las moléculas de la invención que presenten las propiedades de unión específicas, por ejemplo, unión concurrente a múltiples epítopos. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.347.935; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.643.796; y 6.211.477; cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ fabricado por Becton Dickinson and Company, y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica.

La caracterización de la afinidad de unión a antígeno diana o la afinidad de unión Fc-FcγR, y la valoración del antígeno diana o la densidad del FcγR en la superficie celular se pueden realizan con métodos bien conocidos en la técnica, como puede ser el análisis de Scatchard o mediante el uso de kits siguiendo las instrucciones del fabricante, como puede ser el kit Quantum™ Simply Cellular® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). El uno o más ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediada por FcγR como conoce el experto en la técnica o se describe en el presente documento. En las realizaciones específicas, las moléculas de la invención contienen múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste) se someten a ensayo en un análisis de ELISA para la unión a uno o más antígenos diana o uno o más FcγR, por ejemplo, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIA; seguido por uno o más ensayos ADCC. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se someten a ensayo además utilizando un ensayo a base de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en resonancia de plasmón superficial son bien conocidos en la técnica y además se describen en la sección 5.4.3, y se ejemplifican en el presente documento, por ejemplo, en el ejemplo 6.1.

En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste) se caracterizan además en un modelo animal para determinar la interacción con un antígeno diana (por ejemplo, un FcγR) o la interacción Fc-FcγR. Cuando se van a valorar interacciones Fc-FcγR, los modelos animales preferidos que se utilizan en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.877.397, y 6.676.927 que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Otros ratones transgénicos que se utilizan en tales métodos incluyen, pero no se limitan a, ratones FcγRIIIA deficientes desnudos portadores de FcγRIIIA humano; ratones FcγRIIIA deficientes desnudos portadores de FcγRIIA humano; ratones FcγRIIIA deficientes desnudos portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones FcγRIIIA deficientes desnudos portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones FcγRIIIA y FcγRIIA deficientes desnudos portadores de FcγRIIIA y FcγRIIA humanos y ratones FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB deficientes desnudos portadores de FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB humano.

5.4.1 ENSAYOS DE UNIÓN QUE CONTIENEN FcγR

La caracterización de la unión a FcγR con moléculas que comprenden un dominio Fc (o parte de éste) y/o que comprenden el dominio de unión a epítopo específico para un FcγR se puede realizar utilizando cualquier FcγR, incluyendo, pero sin limitarse a, variantes polimórficas de FcγR. En algunas realizaciones, se utiliza una variante polimórfica de FcγRIIIA, que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras realizaciones, la caracterización se realiza utilizando una variante polimórfica de FcγRIIIA que contenga una valina en la posición 158. La variante polimórfica 158V de FcγRIIIA presenta mayor afinidad para IgG1 que la variante 158F y una actividad ADCC aumentada (véase, por ejemplo, Koene *et al*. (1997) "*Fc gammaRIIIa-158V/F Polymorphism Influences The Binding Of IgG By Natural Killer Cell Fc gammaRIIIa, Independently Of The Fc gammaRIIIa-48L/R/H Phenotipo*", Blood, 90: 1109-14; Wu *et al*. (1997) "*A Novel Polymorphism Of FcgammaRIIIa (CD16) Alters Receptor Function And Predisposes To Autoimmune Disease*", J. Clin. Invest. 100: 1059-70; este residuo de hecho interacciona directamente con la región bisagra inferior de IgG1 como se demostró recientemente por estudios de cocristalización de IgG1-FcγRIIIA, véase, por ejemplo, Sondermann *et al*. (2000) "*The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgGl Fc Fragment-Fc gammaRIII complex",* Nature, 406(6793):267-273. Estudios han demostrado que en algunos casos, anticuerpos terapéuticos han mejorado la eficacia en pacientes homocigotos para la variante 158V de FcγRIIIA. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado rituximab fue terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigotos con la variante 158V de FcγRIIIA en comparación con pacientes homocigotos para 158F de FcγRIIIA (véase, por ejemplo, Cartron *et al*. (2002) "*Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcgammaRIIIA Gene*", Blood, 99(3): 754-758). En otras realizaciones, las

moléculas terapéuticas que comprenden esta región también pueden ser más eficaces en pacientes heterocigotos para la variante 158V de FcγRIIIA y 158F de FcγRIIIA, y en pacientes con la variante 131H de FcγRIIA. Aunque no se pretende restringirse a ningún mecanismo de acción particular, la selección de las moléculas de la invención con alotipos alternativos puede ofrecer variantes que una vez manipulados por ingeniería para dar diacuerpos terapéuticos serán clínicamente más eficaces para pacientes homocigotos para tales alotipos.

Un ensayo de unión a FcγR se desarrolló para determinar la unión de las moléculas de la invención a FcγR, y, en particular, para determinar la unión de los dominios Fc a FcγR. Los ensayos permitieron realizar la detección y cuantificación de las interacciones Fc-FcγR, a pesar de la débil afinidad inherente del receptor para su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para FcγRIIB y FcγRIIIA. El método se describe con detalle en la solicitud internacional WO 04/063351 y las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514. En resumen, el método implica la formación de un complejo de FcγR que se puede preparar en cualquier inmunoensayo convencional conocido en la técnica, por ejemplo, FACS, ELISA, resonancia de plasmón superficial, etc. Además, el complejo FcγR tiene una avidez mejorada para una región Fc, respecto a un FcγR no complejado. De acuerdo con la invención, el complejo molecular preferido es un complejo tetramérico inmunitario, que comprende: (a) la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) operativamente unida al extremo carboxilo-terminal de la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una razón molar para formar un complejo FcγR tetramérico (preferiblemente en una razón molar 5:1). La proteína de fusión se biotinila mediante métodos enzimáticos, empleando, por ejemplo, la enzima Bir A de *E. coli*, una biotina ligasa que biotinila específicamente un residuo de lisina en la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. Las proteínas FcγR solubles biotiniladas luego se mezclan con SA-PE en una razón molar 1X SA-PE:5X FcγR soluble biotinilado para formar un complejo tetramérico de FcγR.

Los polipéptidos que comprenden las regiones Fc han demostrado unirse a los complejos tetraméricos de FcγR con al menos una afinidad 8 veces superior a la de FcγR monomérico no complejado. La unión de los polipéptidos que comprenden las regiones Fc a los complejos tetraméricos FcγR se puede determinar empleando las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, como puede ser por ejemplo, la selección de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos ELISA, etc.

Los complejos inmunitarios que comprenden moléculas de la invención, y formados de acuerdo con los métodos antes descritos, pueden usarse para determinar la funcionalidad de las moléculas que comprenden una región Fc en ensayos a base de células o libres de células.

Por conveniencia, los reactivos pueden ser proporcionados en un kit para ensayo, es decir, una combinación envasada de reactivos para someter a ensayo la capacidad de las moléculas que comprenden regiones Fc para unirse a los complejos tetraméricos de FcγR. Otras formas de complejos moleculares para utilizarlas para determinar interacciones Fc-FcγR también se consideran útiles en los métodos de la invención, por ejemplo, las proteínas de fusión formadas como se describe en la solicitud provisional estadounidense 60/439.709, presentada el 13 de enero de 2003.

5.4.2 ENSAYOS FUNCIONALES DE MOLÉCULAS CON CADENAS PESADAS VARIANTES

Las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, dominios Fc (o partes de éstos) pueden caracterizarse empleando ensayos conocidos por los expertos en la técnica para identificar la función de células efectoras de las moléculas. En particular, las moléculas de la invención pueden caracterizarse para determinar la función de células efectoras mediada por FcγR. Además, cuando al menos uno de los antígenos diana de la molécula de diacuerpo de la invención es un FcγR, la unión del FcγR por la molécula de diacuerpo puede servir para activar rutas mediada por FcγR similares a las activadas por la unión de FcγR-Fc. Por tanto, cuando al menos un dominio de unión a epítopo de la molécula de diacuerpo reconoce un FcγR, la molécula de diacuerpo puede desencadenar la función de célula efectora mediada por FcγR sin contener un dominio Fc (o parte de éste), o sin la unión concomitante Fc-FcγR. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden someter a ensayo de acuerdo con la invención, incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. Es posible utilizar cualquier ensayo a base de células o libre de células conocido por los expertos en la técnica para determinar la actividad de la función de células efectoras (para ver los ensayos de células efectoras, véase Perussia *et al*. (2000) "*Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Citotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Citotoxicity) In Human Natural Killer Cells*", Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini *et al*. (1988) "*Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity",* Experientia, 44(10): 841-848; Lehmann *et al*. (2000) "*Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry*", J. Immunol. Methods, 243(1-2): 229-42; Brown (1994) "*In vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction",* Methods Cell Biol., 45: 147-64; Munn *et al*. (1990) "*Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor",* J. Exp. Med., 172: 231 -237, Abdul-Majid *et al*. (2002) "*Fc Receptors Are Critical For*

Autoimmune Inflammatory Damage To The Central Nervous System In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding *et al*. (1998) "*Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino acids",* Immunity 8:403-411.

En una realización, las moléculas de la invención pueden someterse a ensayo para determinar la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. De modo alternativo, la fagocitosis mediada por FcγR de las moléculas de la invención puede someterse a ensayo en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse empleando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Brown (1994) "*In vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction*", Methods Cell Biol., 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas de la invención se caracteriza midiendo la capacidad de células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG fluoresceinada por los métodos ya descritos (Tridandapani *et al*. (2000) "*The Adapter Protein L AT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells",* J. Biol. Chem. 275: 20480-20487).

Otro ensayo a modo de ejemplo para determinar la fagocitosis de las moléculas de la invención es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) que puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula diana, como puede ser FITC marcado con *Escherichia coli* (Molecular Probes) o FITC marcado con *Staphylococcus aureus* con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo natural, un anticuerpo anti-fluoresceína (véase Bedzyk *et al*. (1989) "*Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotipo Family",* J. Biol. Chem, 264(3): 1565-1569), como el anticuerpo de control para el ensayo ADCP dependiente de FcγR; o (ii) el anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que anula la unión a FcγRIII, como control de fondo para el ensayo ADCP dependiente de FcγR (iii) un diacuerpo que comprende el dominio de unión a epítopo del anticuerpo 4-4-20 y un dominio Fc y/o un dominio de unión a epítopo específico para FcγRIII; y la formación de la partícula opsonizada; la adición de cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a las células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible de ATCC) en una razón 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1 o 100:1 para permitir que ocurra la fagocitosis mediada por FcγR; preferiblemente incubando las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37ºC durante 1,5 horas; la adición de azul trípano después de la incubación (preferiblemente a temperatura ambiente durante 2-3 min) a las células para extinguir la fluorescencia de las bacterias que se adhieren al exterior de la superficie celular sin ser internalizadas; la transferencia de células a un tampón para FACS (por ejemplo, 0,1%, BSA en PBS, 0,1% de azida de sodio), analizando la fluorescencia de células THP1 empleando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferiblemente, las células THP-1 que se utilizan en el ensayo se analizan por FACS para determinar la expresión de FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan CD32A y CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea para realizar el ensayo ADCP de acuerdo con los métodos de la invención. Las células THP-1 preferiblemente se bloquean con IgG1 soluble 100 µg/ml o suero humano al 10%. Para analizar la magnitud de la ADCP, la compuerta preferiblemente se establece en las células THP-1 y se mide la mediana de la intensidad de fluorescencia. La actividad ADCP para mutantes individuales se calcula y se notifica como valor normalizado para el Acmqu 4-4-20 de tipo natural obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a células THP-1 de tal manera que la razón de las partículas opsonizadas con respecto a las células THP-1 es de 30:1 o 60:1. En las realizaciones más preferidas, el ensayo ADCP se realiza con controles, como pueden ser *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para que sirvan como actividad ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FYTC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo natural (para que sirva como actividad ADCP dependiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1, la variante D265A del anticuerpo 4-4-20 (para que sirva como control de fondo para la actividad ADCP dependiente de FcγR).

En otra realización, las moléculas de la invención pueden someterse a ensayo para determinar la actividad ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, empleando cualquiera de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Perussia *et al*. (2000) "*Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Citotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Citotoxicity) In Human Natural Killer Cells",* Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Weng *et al*. (2003) "*Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma*", J. Clin. Oncol. 21: 3940-3947; Ding *et al*. (1998) "*Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino acids*", Immunity 8:403-411). Un ensayo a modo de ejemplo para determinar la actividad ADCC de las moléculas de la invención se basa en un ensayo de liberación de ^{51}Cr que consiste en: marcar células diana con $[^{51}Cr]Na_2CrO_4$ (esta molécula permeable en la membrana celular se utiliza comúnmente para marcaje puesto que se une a las proteínas citoplásmicas y aunque es liberada espontáneamente de células con cinética lenta, se libera masivamente después de la necrosis de células diana); opsonización de células diana con las moléculas de la invención que comprenden cadenas pesadas variantes; la combinación de células diana radiomarcadas, opsonizadas con células efectoras en una placa de microtitulación en una razón apropiada de células diana con respecto a células efectoras; la incubación de la mezcla de células durante 16-18 horas a 37ºC; la recogida de los sobrenadantes; y el análisis de la radiactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la invención entonces se puede determinar, por ejemplo, empleando la siguiente fórmula: % lisis = (cpm experimental – cpm de fuga objetivo)/(cpm de lisis con detergente – cpm de fuga objetivo) x 100%. Como alternativa, % lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima - liberación espontánea). La lisis específica se puede calcular

empleando la fórmula: lisis específica = % lisis con las moléculas de la invención - % lisis en ausencia de las moléculas de la invención. Es posible generar una gráfica variando la razón diana:celular efectora o concentración de anticuerpo.

Preferiblemente, las células efectoras que se utilizan en los ensayos ADCC de la invención son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que preferiblemente son purificadas de sangre humana normal empleando los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll Paque. Las células efectoras preferidas para utilizarlas en los métodos de la invención expresan diferentes receptores activadores de FcγR. La invención abarca células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y monocitos derivados de macrófagos primarios derivados de sangre humana completa que expresan FcγRIIIA y FcγRIIB, para determinar si los mutantes de cadena pesada de los anticuerpos muestran actividad ADCC aumentada y fagocitosis respecto a los anticuerpos IgG1 de tipo natural.

La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis mediante la expresión del receptor de alta afinidad FcγRI y el receptor de baja afinidad FcγRIIA (Fleit *et al*. (1991) "*The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses Fc Gamma RI And Fc Gamma RII*", J. Leuk. Biol. 49: 556-565). Las células THP-1 no expresan de manera constitutiva FcγRIIA o FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas afecta al patrón de expresión de FcR (Pricop *et al*. (2001) "*Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines*", J. of Immunol., 166: 531-537). El crecimiento de células THP-1 en presencia de citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y ocasiona una disminución en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB también puede potenciarse mediante densidad celular aumentada (Tridandapani *et al*. (2002) "*Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RUB In Human Monocytic Cells*", J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). Por el contrario, se ha notificado que IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIIA (Pearse *et al*. (1993) "*Interferon Gamma-Induced Transcription Of The High-Affinity Fc Receptor For IgG Requires Assembly Of A Complex That Includes The 91-kDa Subunit Of Transcription Factor 1SGF3*", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 4314-4318). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular se puede determinar utilizando FACS con los métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. La expresión de FcγR inducida por citocinas en la superficie celular proporciona un sistema para someter a prueba la activación e inhibición en presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 son incapaces de expresar FcγRIIB, la invención también abarca otra línea celular de monocitos humanos, U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian de manera terminal en macrófagos en presencia de IFNγ y TNF (Koren *et al*. (1979) "*In vitro Activation Of A Human Macrophage -Like Cell Line*", Nature 279: 328-331).

La aniquilación de células tumorales dependiente de FcγR está mediada por células NK y macrófagos en modelos tumorales en ratones (Clynes *et al*. (1998) "*Fc Receptors Are Required In Passive And Active Immunity To Melanoma*", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 652-656). La invención abarca el uso de monocitos elutriados derivados de donantes como células efectoras para analizar la eficiencia de los mutantes de Fc para activar la citotoxicidad celular de células diana en ensayos de fagocitosis y ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIIA, y FcγRIIB se ve afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de FcγR a partir de monocitos elutriados, congelados, monocitos elutriados, frescos, monocitos mantenidos en FBS al 10%, y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y/o en suero humano se pueden determinar empleando los métodos comunes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, es posible teñir las células con anticuerpos específicos de FcγR y analizarlas por FACS para determinar los perfiles de FcR. Las condiciones que imitan mejor la expresión de FcγR *in vivo* de los macrófagos luego se utilizan para los métodos de la invención.

En algunas realizaciones, pueden usarse células de ratón especialmente cuando no se pueden obtener células humanas con los perfiles de FcγR correctos. En algunas realizaciones, puede usarse la línea celular macrófagos de ratón RAW264.7(ATCC) que puede transfectarse con FcγRIIIA humano y los transfectantes estables se aíslan utilizando los métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ralph *et al*. (1977) "*Antibody-Dependent Killing Of Erythrocyte And Tumor Targets By Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement By PPD And LPS*", J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes pueden cuantificarse para determinar la expresión de FcγRIIIA con análisis de FACS utilizando experimentación rutinaria, y los transfectantes con alta expresión pueden utilizarse en ensayos ADCC de la invención. En otro métodos, puede haber el aislamiento de macrófagos peritoneales esplénicos que expresen FcγR humano procedente de ratones transgénicos deficientes como los descritos en el presente documento.

Pueden recogerse linfocitos de sangre periférica de donantes (PBM) utilizando un gradiente Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población de células mononucleares aisladas, la mayor parte de la actividad ADCC se encuentra a través de las linfocitos citolíticos naturales (células NK) que contengan FcγRIIIA pero no FcγRIIB en su superficie. Los resultados de los ensayos con estas células indican la eficacia de los mutantes en la activación de ADCC de los linfocitos citolíticos naturales y establecen los reactivos para realizar pruebas con monocitos elutriados.

Las células diana que se utilizan en los ensayos ADCC de la invención incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de registro ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp *et al*. (1976) "*Human Breast Cancer In Culture*", Recent Results Cancer Res. 33-41); linfocitos B; células

derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con número de registro ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein *et al*. (1965) "*Characteristics And Mode Of Growth Of Tissue Culture Strain (EBI) Of Human Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma*." J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), y células de Daudi con número de registro ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein *et al*. (1968) "*Surface IgM-Kappa Specificity On A Burkitt Lymphoma Cell In vivo And In Derived Culture Lines*", Cancer Res. 28: 1300-1310). Las células diana pueden ser reconocidas por el sitio de unión a antígeno de la molécula de diacuerpo que se va a someter a ensayo.

El ensayo ADCC se basa en la capacidad de células NK para mediar en la muerte celular a través de una ruta apoptótica. Las células NK median en la muerte celular en parte por el reconocimiento de FcγRIIIA de un dominio Fc de IgG unido a un antígeno en una superficie celular. Los ensayos ADCC que se utilizan de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser ensayos a base radiactividad o ensayos a base de fluorescencia. El ensayo ADCC utilizado para caracterizar las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes consiste en marcar células diana, por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, la opsonización de células diana con un anticuerpo que reconozca un receptor de superficie celular en la célula diana a través de su sitio de unión a antígeno; la combinación de células diana opsonizadas, marcadas y las células efectoras en una proporción apropiada, que puede determinarse por experimentación rutinaria; cosechar las células; detectar el marcador en el sobrenadante de células diana lisadas, utilizando un esquema de detección apropiado basado en el marcador utilizado. Las células diana pueden ser marcadas con un marcador radiactivo o un marcador fluorescente, empleando los métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo los marcadores incluyen, pero no se limitan a $[^{51}Cr]Na_2CrO_4$; y el éster acetoximetílico del ligando de potenciación de la fluorescencia, 2,2':6'2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (TDA).

En un método preferido, específico, se utiliza un ensayo fluorimétrico con resolución temporal para medir la actividad ADCC contra células diana que han sido marcadas con el éster acetoximetílico del ligando de potenciación de la fluorescencia, 2,2':6'2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (TDA). Tales ensayos fluorimétricos son conocidos en la técnica, por ejemplo, véase, Blomberg *et al*. (1996) "*Time-Resolved Fluorometric Assay For Natural Killer Activity Using Target Cells Labelled With A Fluorescence Enhancing Ligand",* Journal of Immunological Methods, 193: 199-206 totalidad. En resumen, células diana son marcadas con el diéster acetoximetílico de TDA 2,2':6'2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo) (BATDA) permeable a través de la membrana, que rápidamente se difunde a través de la membrana celular de células viables. Las esterasas intracelulares escinden los grupos éster y la molécula TDA impermeable en la membrana, regenerada, se queda atrapada dentro de la célula. Después de la incubación de células efectoras y diana, por ejemplo, durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37ºC, con el 5% de CO_2, la molécula de TDA liberada de células diana lisadas se quela con Eu3+ y se cuantifica la fluorescencia de los quelatos europio-TDA formados en un fluorómetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

En otro método específico, el ensayo ADCC que se utiliza para caracterizar las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste) comprende las siguientes etapas: preferiblemente 4-5 x 10^6 células diana (por ejemplo, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) se marcan con 2,2':6'2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo) (reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficiencia óptima de marcaje, el número de células diana que se utilice en el ensayo ADCC preferiblemente no debe ser superior a 5x10^6. Se añade el reactivo BATDA a las células y la mezcla se incuba a 37ºC, preferiblemente con el 5% de CO_2, durante al menos 30 minutos. Después las células se lavan con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfinpirazol 0,125 mM, y medio que contenga sulfinpirazol 0,125 mM. Las células diana marcadas luego se opsonizan (se recubren) con una molécula de la invención que contenga un dominio de unión a epítopo específico para FcγRIIA y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste). En las realizaciones preferidas, la molécula que se utiliza en el ensayo ADCC también es específica para un receptor de superficie celular, un antígeno de tumor o un antígeno de cáncer. La molécula de diacuerpo de la invención puede unirse específicamente a cualquier antígeno de cáncer o tumor, como pueden ser aquellos que se enumeran en la sección 5.6.1. Las células diana en el ensayo ADCC se eligen de acuerdo con los sitios de unión a epítopo manipulados por ingeniería en el diacuerpo de la invención, de modo que el diacuerpo se una específicamente a un receptor de superficie celular de la célula diana.

Las células diana se añaden a las células efectoras, por ejemplo, PBMC (células mononucleares de sangre periférica), para obtener razones de células efectoras: células diana de aproximadamente 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1 o 100:1. Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37ºC, con el 5% de CO_2. Se recogen los sobrenadantes celulares y se añaden a una disolución ácida de europio (por ejemplo, la disolución DELFIA Europium, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) se determinan mediante la incubación de células diana con TX-100 al 1% y medio solo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpos (AICC) se mide por incubación de células diana y efectoras en ausencia de una molécula que va a someterse a ensayo, por ejemplo, el diacuerpo de la invención. Cada ensayo se realiza preferiblemente por triplicado. La media del porcentaje de la lisis específica se calcula como: liberación experimental (ADCC) - AICC)/(MR-SR) x 100.

Pueden usarse ensayos conocidos en la técnica y ejemplificados en el presente documento para caracterizar la unión de C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) con las moléculas de la

invención que comprenden dominios Fc (o partes de éstos). Para determinar la unión a C1q, puede realizarse un ensayo ELISA de unión a C1q. Un ensayo a modo de ejemplo puede comprender lo siguiente: las placas de ensayo pueden ser recubiertas durante la noche a 4ºC con polipéptido que contenga una molécula de la invención o polipéptido de partida (control) en un tampón de recubrimiento. Después las placas se lavan y se bloquean. Después del lavado, es posible añadir a cada pocillo una alícuota de C1q humano y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de otro lavado puede añadirse a cada pocillo 100 ul de un anticuerpo anti-C1q de complemento producido en oveja conjugado a peroxidasa y se incuba durante una hora a temperatura ambiente. La placa puede lavarse otra vez con tampón de lavado y pueden añadirse a cada pocillo 100 µl de tampón de sustrato que contiene OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma)). Se puede dejar que la reacción de oxidación, observada por la presencia de un color amarillo, avance durante 30 minutos y se detiene por la adición de 100 µl de 4,5 NH_2SO_4. Luego se lee la absorbancia a (492-405) nm.

Para valorar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al*. (1997) "*A Non-Radiactive Complement-Dependent Citotoxicity Assay For Anti-CD20 Monoclonal Antibody",* J. Immunol. Methods 202: 163-171. En resumen, diversas concentraciones de la molécula que comprende un dominio Fc (variante) (o parte de éste) y complemento humano pueden diluirse con tampón. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula de diacuerpo pueden diluirse hasta una densidad de aproximadamente $1x10^6$ células/ml. Las mezclas de las moléculas de diacuerpo que contienen un dominio Fc (variante) (o parte de éste), complemento humano diluido y células que expresan el antígeno pueden ser añadidas a una placa de 96 pocillos para cultivo tisular, de fondo plano y se dejan incubar durante 2 horas a 37ºC y el 5% de CO_2 para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. Se pueden añadir entonces 50 µl de azul de alamar (Accumed International) a cada pocillo y se incuba durante la noche a 37ºC. Se mide la absorbancia utilizando un fluorómetro de placas de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Las concentraciones de las muestras se pueden calcular a partir de una curva patrón y para la variante de interés se notifica el porcentaje de actividad en comparación con una molécula sin variante, es decir, una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc sin variante.

5.4.3 OTROS ENSAYOS

Las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc pueden someterse a ensayo empleando cualquiera de los ensayos a base de resonancia de plasmón superficial conocidos en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión a antígeno o unión Fc-FcγR. Cualquier instrumento de SPR disponible en el comercio incluyendo pero sin limitarse a, los instrumentos BIAcore, disponibles de Biacore AB (Uppsala, Suecia); los instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, MA.); el sistema IBIS disponible de Windsor Scientific Limited (Berks, RU), los sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y SPR Detector Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, TX) se pueden utilizar en la presente invención. Para realizar una revisión de la tecnología basada en SPR (resonancia de plasmón superficial) véase Mullet *et al*. (2000) "*Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays",* Methods 22: 77-91; Dong *et al*. (2002) "*Some new aspects in biosensors*", Reviews in Mol. Biotech. 82: 303-23; Fivash *et al*. (1998) "*BIAcore For Macromolecular Interaction",* Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich *et al* (2000) "*Advances In Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis",* Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61. Además, cualquiera de los instrumentos de SPR y métodos basados en SPR para medir interacciones proteína-proteína descritos en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125, se consideran en los métodos de la invención.

En resumen, los ensayos basados en SPR implican la inmovilización de un miembro de un par de unión en una superficie y monitorizar su interacción con el otro miembro del par de unión en disolución y en tiempo real. El análisis de SPR se basa en la medición del cambio del índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que sucede tras la formación o disociación del complejo. La superficie en la que ocurre la inmovilización es el chip sensor, que está en el núcleo de la tecnología SPR; que consiste en una superficie de vidrio recubierta con una capa delgada de oro y forma la base para una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Diversos chips sensores están a la disposición en el comercio, especialmente de las empresas que se enumeraron anteriormente, todos los cuales pueden utilizarse en los métodos de la invención. Los ejemplos de los chips sensores pueden ser los disponibles de BIAcore AB, Inc., por ejemplo, el chip sensor CM5, SA, NTA y HPA. Una molécula de la invención puede ser inmovilizada sobre la superficie de un chip sensor utilizando cualquiera de los métodos y las químicas de inmovilización conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, acoplamiento covalente directo mediante grupos amina, acoplamiento covalente directo mediante grupos sulfhidrilo, unión de biotina a una superficie recubierta con avidina, acoplamiento de aldehído a grupos hidrato de carbono y unión mediante la etiqueta de histidina con chips de NTA.

En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc, a un antígeno o un FcγR se pueden determinar utilizando un instrumento BIAcore (por ejemplo, instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Como se comentó anteriormente, véase la sección 5.4.1, cualquier FcγR puede utilizarse para evaluar la unión de las

moléculas de la invención cuando al menos un sitio de unión a epítopo de la molécula de diacuerpo reconoce de manera inmunoespecífica un FcγR, y/o cuando la molécula de diacuerpo contiene un dominio Fc (o parte de éste). En una realización específica, el FcγR es FcγRIIIA, preferiblemente un FcγRIIIA monomérico soluble. Por ejemplo, en una realización, el FcγRIIIA monomérico soluble es la región extracelular de FcγRIIIA unida a la secuencia ligador – AVITAG (véase, la solicitud provisional estadounidense n.º 60/439.498, presentada el 9 de enero de 2003 y la solicitud provisional estadounidense n.º 60/456.041 presentada el 19 de marzo de 2003). En otra realización específica, el FcγR es FcγRIIB, preferiblemente un FcγRIIB dimérico soluble. Por ejemplo en una realización, la proteína FcγRIIB dimérica soluble se prepara de acuerdo con la metodología descrita en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/439.709 presentada el 13 de enero de 2003.

En todos los ensayos inmunológicos el reconocimiento/unión de FcγR con una molécula de la invención puede ser efectuado mediante múltiples dominios: en ciertas realizaciones, las moléculas de la invención reconocen de manera inmunoespecífica un FcγR a través de uno de los múltiples dominios de unión a epítopo; en todavía otras realizaciones, cuando la molécula de la invención contiene un dominio Fc (o parte de éste), la molécula de diacuerpo puede reconocer de manera inmunoespecífica un FcγR por las interacciones Fc-FcγR; en todavía otras realizaciones, cuando una molécula de la invención comprende un dominio Fc (o parte de éste) y un sitio de unión a epítopo que reconoce de manera inmunoespecífica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede reconocer un FcγR a través de un dominio de unión a epítopo o el dominio Fc (o parte de éste). Un ensayo a modo de ejemplo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste) a un antígeno y/o un FcγR utilizando un instrumento BIAcore, comprende lo siguiente: un primer antígeno es inmovilizado en una de las cuatro celdas de flujo de una superficie de chip sensor, preferiblemente mediante química de acoplamiento con amina de modo que aproximadamente 5000 unidades de respuesta (RU, *response units*) de dicho primer antígeno se inmovilicen en la superficie. Una vez que se prepara una superficie apropiada, las moléculas de la invención que reconocen de manera inmunoespecífica el primer antígeno se pasan por la superficie, preferiblemente mediante inyecciones de un minuto de una disolución 20 µg/ml a una velocidad de flujo de 5 µl/ml. Los niveles de moléculas de la invención unidas a la superficie en esta etapa por lo regular oscilan entre 400 y 700 RU. A continuación, se inyectan series de diluciones de un segundo antígeno (por ejemplo, FcγR) o el receptor FcγR en el tampón HBS-P (HEPES 20mM, NaCl 150 mM, EDTA 3mM, pH 7,5) sobre la superficie a 100 µl/min. La regeneración de las moléculas entre diferentes diluciones del segundo antígeno o el receptor se lleva a cabo preferiblemente mediante inyecciones individuales de 5 segundos de $NaHCO_3$ 100 mM, pH 9,4; NaCl 3 M. En el método de la invención se considera cualquier técnica de regeneración conocida en la técnica.

Una vez que se recopila la serie completa de datos, las curvas de unión resultantes se ajustan de manera global utilizando algoritmos de cómputo que suministra el fabricante del instrumento de SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan las constantes K_{on} y K_{off} a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_d, como el cociente de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{on}/K_{off}). Tratamientos más detallados de cómo se derivan cada una de las constantes de velocidad se pueden encontrar en el manual del software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos derivados se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Para realizar una revisión de los diferentes métodos de interpretación de los datos cinéticos derivados véase Myszka (1997) "*Kinetic Analysis Of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors",* Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher *et al*. (1994) "*Surface Plasmon Resonance Based Methods For Measuring The Kinetics And Binding Affinities Of Biomolecular Interactions*", Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy (1994) "*Determination Of Kinetic Rate And Equilibrium Binding Constants For Macromolecular Interactions: A Critique Of The Surface Plasmon Resonance Literature*", Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken *et al*. (1992) "*Analysis Of Macromolecular Interactions Using Immobilized Ligands*", Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton *et al*. (1995) "*Interpreting Complex Binding Kinetics From Optical Biosensors: A Comparison Of Analysis By Linearization, The Integrated Rate Equación, And Numerical Integration*", Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy *et al*., 1996, Analytical Biochemistry 236: 275-83.

Los parámetros cinéticos determinados utilizando un análisis de SPR, por ejemplo, BIAcore, pueden utilizarse como una medida predictiva de cómo funcionará una molécula de la invención en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un método a modo de ejemplo para predecir la eficacia de una molécula de la invención basándose en los parámetros cinéticos derivados a partir de un análisis de SPR puede comprender lo siguiente: determinar los valores de K_{off} para la unión de una molécula de la invención a FcγRIIIA y FcγRIIB (mediante un dominio de unión a epítopo y/o un dominio Fc (o parte de éste)); representar gráficamente (1) K_{off} (de tipo natural)/K_{off} (mutante) para FcγRIIIA; (2) K_{off} (mutante)/K_{off} (de tipo natural) para FcγRIIB contra los datos de ADCC. Números mayores de uno muestran una velocidad de disociación disminuida para FcγRIIIA y una velocidad de disociación aumentada para FcγRIIB respecto al de tipo natural; y presenta una función ADCC mejorada.

5.5 MÉTODOS PARA PRODUCIR MOLÉCULAS DE DIACUERPO DE LA INVENCIÓN

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden producirse empleando diversos métodos bien conocidos en la técnica, como puede ser la síntesis de proteína *de novo* y expresión recombinante de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencia de ácidos nucleicos deseadas se pueden producir por

métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis por PCR de una variante previamente preparada del polinucleótido deseado) o por síntesis de ADN en fase sólida. Por lo regular se utilizan métodos de expresión recombinante. Un polinucleótido puede comprender una secuencia que codifica los dominios VH y/o VL de CD16A; en otro aspecto, un polinucleótido puede comprender una secuencia que codifica un VH y/o VL de CD32B. Debido a la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ácido nucleico codifican cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina.

5.5.1 POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos se puede determinar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos de las moléculas que son identificadas por los métodos de la invención, la secuencia de nucleótidos puede manipularse por ingeniería empleando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al*. 2001, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, generando sustituciones, deleciones, y/o inserciones de los aminoácidos.

En una realización, pueden examinarse bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica mediante técnicas convencionales conocidas por clonar los ácidos nucleicos que codifiquen las moléculas de la invención.

5.5.2 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

Una vez que se haya derivado una secuencia de ácido nucleico que codifique las moléculas de la invención (es decir, los anticuerpos) el vector para la producción de las moléculas se puede producir mediante la tecnología del ADN recombinante empleando técnicas bien conocidas en la técnica. Los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse para construir vectores de expresión que contengan las secuencias codificantes para las moléculas de la invención y señales de control de la transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel *et al*. eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada por los métodos de la invención puede ser transferido a una célula huésped por técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal y precipitación con fosfato de calcio) y las células transfectadas entonces se cultivan mediante las técnicas convencionales para producir las moléculas de la invención. En las realizaciones específicas, la expresión de las moléculas de la invención está regulada por un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido.

Las células huésped que se utilizan para expresar las moléculas identificadas por los métodos de la invención pueden ser células bacterianas como *Escherichia coli*, o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, para producir inmunoglobulinas, un sistema de expresión eficaz son las células de mamífero, como pueden ser las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, como puede ser el elemento promotor génico temprano intermedio, principal de citomegalovirus humano (Foecking *et al*. (1986) "*Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors*", Gene 45:101-106; Cockett *et al*. (1990) "*High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification*", Biotechnology 8:662-667).

Es posible utilizar diversos sistemas huésped-vector de expresión para expresar las moléculas identificadas por los métodos de la invención. Tales sistemas-vector de expresión representan vehículos mediante los que las secuencias codificantes de las moléculas de la invención pueden ser producidas y posteriormente purificadas, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresan las moléculas de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión tipo ADN recombinante de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contengan secuencias codificantes para las moléculas identificadas por los métodos de la invención; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces pichia*) transformada con vectores de expresión recombinante de levadura que contengan secuencias que codifiquen las moléculas identificadas por los métodos de la invención; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, baculovirus) que contengan las secuencias codificantes de las moléculas identificadas por los métodos de la invención; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (MVCo) y virus del mosaico de tabaco

(VMT) o transformados con vectores de expresión plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contengan las secuencias que codifiquen las moléculas identificadas por los métodos de la invención; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfoticas (véase la patente estadounidense 5.807.715), células Per C.6 (células retinnianas humanas desarrolladas por Crucell) que alberguen constructos de expresión recombinante que contengan promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor metalotioneina) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; promotor 7.5K de virus vaccinia).

En sistemas bacterianos diversos vectores de expresión se pueden seleccionar ventajosamente dependiendo del uso propuesto para la molécula que se va a expresar. Por ejemplo, cuando se va a producir una cantidad grande de tal proteína, para la producción de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser convenientes vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos proteína de fusión que se purifiquen fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Riither *et al*. (1983) "*Easy Identification Of cDNA Clones*", EMBO J. 2: 1791 -1794), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo puede ser ligada de manera individual en el vector en marco con la región codificante de *lacZ* para que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye *et al*. (1985) "*p-Promoter Mutations In The lpp Gene Of Escherichia Coli*", Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke *et al*. (1989) "*Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia Coli*", J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También es posible utilizar vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden ser purificadas fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa de matriz seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de trombina o factor Xa proteasa para que el producto génico diana clonado se pueda liberar del resto GST.

En un sistema de insecto, se utiliza el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (VPNAc) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede ser clonada de manera individual en regiones no esenciales {por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y se puede colocar bajo el control de un promotor de VPNAc (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamífero es posible utilizar diversos sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ser ligada a un complejo para control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede entonces ser insertado en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) producirá un virus recombinante viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan *et al*. (1984) "*Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). Para la traducción eficiente de las secuencias codificantes de anticuerpos, insertadas también pueden ser necesarias señales de iniciación específicas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Más aún, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de la traducción exógenas y los codones de iniciación pueden ser de orígenes diversos, naturales y sintéticos. La eficiencia de expresión se puede mejorar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bitter *et al*. (1987) "*Expression And Secretion Vectors For Yeast*", Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, es posible elegir una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico en el modo específico que se desee. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisió) de los productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una molécula de diacuerpo de la invención se pueden expresar como un solo producto génico (por ejemplo, como una sola cadena polipeptídica, es decir, como precursor de poliproteína), que requiere la escisión proteolítica mediante mecanismos celulares nativos o recombinantes para formar polipéptidos diferentes de las moléculas de diacuerpo de la invención. Puede manipularse por ingeniería una secuencia de ácido nucleico para codificar una molécula precursora de poliproteína que contiene los polipéptidos de la invención, lo que incluye secuencias codificantes capaces de dirigir la escisión postraduccional del precursor de poliproteína. La escisión postraduccional del precursor de poliproteína da como resultado los polipéptidos de la invención. La escisión postraduccional de la molécula precursora que comprende los polipéptidos de la invención se puede obtener *in vivo* (es decir, dentro de la célula huésped mediante sistemas celulares/mecanismos recombinantes o nativos, por ejemplo, la escisión de furina en un sitio apropiado) o pueden producirse *in vitro* (por ejemplo, la incubación de la cadena polipeptídica en una composición que comprende proteasas o peptidasas de actividad conocida y/o en una composición que comprende las condiciones o los reactivos conocidos por fomentar la acción proteolítica deseada). La purificación y modificación de las proteínas recombinantes es bien conocida en la técnica, de modo que el diseño del precursor de poliproteína podría incluir varias realizaciones fácilmente apreciadas por el trabajador experto. Cualquiera de las proteasas o peptidasas conocidas en la técnica se puede utilizar para la modificación descrita de la molécula precursora, por ejemplo, trombina (que reconoce la secuencia de aminoácidos LVPR^GS (ID SEC NO: 89)), o el factor Xa (que reconoce la secuencia de aminoácidos I(E/D)GR^ (ID SEC NO: 90) (Nagai *et al*. (1985) "*Oxygen Binding Properties Of Human*

Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7252-7255, y revisado en Jenny *et al*. (2003) "*A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa*", Protein Expr. Purif. 31: 1-11, enterocinasa (que reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK^ (ID SEC NO: 91) (Collins-Racie *et al*. (1995) "*Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA*", Biotechnology 13:982-987 que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad)), furina (que reconoce la secuencia de aminoácidos RXXR^, con preferencia para RX(K/R)R^ (ID SEC NO: 92 e ID SEC NO: 93, respectivamente) (R adicional en la posición P6 parece potenciar la escisión)), y AcTEV (que reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ^G (ID SEC NO: 94) (Parks *et al*. (1994) "*Release Of Proteins And Peptidos From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase*", Anal. Biochem. 216:413-417 que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad)) y la proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa. Véase por ejemplo, la sección 6.4, anteriormente.

Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de las proteínas y los productos génicos. Líneas celulares o sistemas huéspedes apropiados se pueden elegir para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Para este fin, es posible utilizar células huésped eucariotas que presenten la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción con alto rendimiento y a largo plazo de proteínas recombinantes se prefiere expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de manera estable un anticuerpo de la invención pueden estar manipuladas por ingeniería. En lugar de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación viral, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, las células manipuladas por ingeniería pueden dejarse crecer durante 1-2 días en medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para manipular por ingeniería líneas celulares que expresen los anticuerpos de la invención. Estas líneas celulares manipuladas por ingeniería pueden ser particularmente útiles para examinar y evaluar compuestos que interactúen directa o indirectamente con las moléculas de la invención.

Es posible utilizar diversos sistemas de selección incluyendo pero sin limitarse a, los genes de timidina cinasa del virus de herpes simple (Wigler *et al*. (1977) "*Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells*", Cell 11: 223-232), de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska *et al*. (1992) "*Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In ADN-Mediated Transformation Of Mammalian Cells: First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy*", Bioessays 14: 495-500), y de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al* (1980) "*Isolation Of Transforming ADN: Cloning The Hamster aprt Gene",* Cell 22: 817-823) se pueden emplear en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Asimismo, es posible utilizar resistencia a los antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al*. (1980) "*Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; O'Hare *et al*. (1981) "*Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihidrofolate Reductase*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527-1531); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan *et al*. (1981) "*Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Fosforibosyltransferase*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076); *neo*, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Tolstoshev (1993) "*Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions*", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "*The Basic Science Of Gene Therapy*", Science 260:926-932; y Morgan *et al*. (1993) "*Human Gene Therapy",* Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217) y *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al*. (1984) "*Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant -Selection Markers In Mouse L Cells*", Gene 30: 147-156). Los métodos comúnmente conocidos en la tecnología del ADN recombinante que pueden utilizarse se describen en Ausubel *et al*. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al*. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al*. (1981) "*A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells*", J. Mol. Biol. 150: 1-14.

Los niveles de expresión de una molécula de la invención pueden aumentarse por amplificación de los vectores (para realizar una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in ADN cloning, Vol. 3 (Academic Press. Nueva York, 1987). Cuando un marcador en un sistema vector que expresa un anticuerpo puede ser amplificado, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada se asocia con la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de la molécula de diacuerpo, también aumentará la producción del polipéptido (Crouse *et al*. (1983) "*Expression And Amplification Of Engineered*

Mouse Dihidrofolate Reductase Minigenes", Mol. Cell. Biol. 3:257-266).

La célula huésped puede ser cotransfectada con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector el primer polipéptido de la molécula de diacuerpo y codificando el segundo vector el segundo polipéptido de la molécula de diacuerpo. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan obtener igual expresión de ambos polipéptidos. Como alternativa, es posible utilizar un solo vector que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias codificantes para los polipéptidos de las moléculas de la invención pueden contener ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de la invención (es decir, diacuerpos) haya sido expresada por métodos recombinantes, se puede purificar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos (por ejemplo, análogos a los esquemas de purificación de anticuerpos basados en la selectividad de los antígenos) por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico (como opción, después de la selección de la Proteína A cuando la molécula de diacuerpo contiene un dominio Fc (o parte de éste)), y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos.

5.6 MÉTODOS PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección cuando se desea la función de células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa). Como se analizó anteriormente, los diacuerpos de la invención pueden presentar funcionalidad tipo anticuerpo para desencadenar una función efectora aunque la molécula de diacuerpo no comprenda un dominio Fc. Al comprender al menos un dominio de unión a epítopo que reconozca de manera inmunoespecífica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede presentar unión a FcγR y actividad análogas a las interacciones Fc-FcγR. Por ejemplo, las moléculas de la invención pueden unirse a un antígeno de superficie celular y un FcγR (por ejemplo, FcγRIIIA) en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, célula NK), estimulando una función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) contra tal célula.

En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo de la invención comprende un dominio Fc (o parte de éste). En tales realizaciones, el dominio Fc puede comprender además al menos una modificación de aminoácido en relación con el dominio Fc de tipo natural (o parte de éste) y/o puede contener dominios de uno o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc variantes pueden presentar fenotipos conferidos o alterados respecto a las moléculas que comprenden el dominio Fc de tipo natural, como puede ser una actividad de función efectora alterada o conferida (por ejemplo, tal como se determina en un ensayo dependiente de células NK o dependiente de macrófagos). En tales realizaciones, las moléculas de la invención con actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección cuando se desea una eficacia mejorada de la actividad de la función efectora. En ciertas realizaciones, las moléculas de diacuerpo de la invención que contienen un dominio Fc (o parte de éste) median en la cascada dependiente del complemento. Las variantes del dominio Fc identificadas como que alteran la función efectora se describen en la solicitud internacional WO 04/063351, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2005/0037000 y 2005/0064514, las solicitudes provisionales estadounidenses 60/626.510, presentada el 10 de noviembre de 2004, 60/636.663, presentada el 15 de diciembre 2004, y 60/781.564, presentada el 10 de marzo de 2006, y solicitudes de patente estadounidenses 11/271.140, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los inventores.

Las moléculas de la invención son particularmente útiles para la prevención, inhibición, disminución del crecimiento o regresión de tumores primarios, metástasis de células cancerosas y enfermedades infecciosas. Aunque no se pretende restringirse a ningún mecanismo de acción específico, las moléculas de la invención median en la función efectora produciendo aclaramiento del tumor, disminución del tumor o una combinación de estos. En realizaciones alternativas, los diacuerpos de la invención median en la actividad terapéutica mediante reticulación de receptores y/o antígenos de superficie celular y potencian la apoptosis o la señalización de los reguladores negativos del crecimiento.

Aunque no se pretende apegarse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de diacuerpo de la invención presentan eficacia terapéutica mejorada respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo a unirse de manera inmunoespecífica a una célula diana que exprese un antígeno específico (por ejemplo, FcγR) a niveles disminuidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del diacuerpo de permanecer en la célula diana más tiempo debido a una avidez mejorada de la interacción diacuerpo-epítopo.

Los diacuerpos de la invención con afinidad y avidez mejorada para los antígenos (por ejemplo, FcγR) son particularmente útiles para el tratamiento, prevención o manejo de un cáncer, u otras enfermedades o trastornos, en un individuo, en donde los FcγR se expresan a niveles bajos en las poblaciones de células diana. Como se utiliza en el presente documento, la expresión de FcγR en células se define en términos de la densidad de tales moléculas por

célula, tal como se mide utilizando los métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. Las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión a epítopo y, como opción, un FcγR (o parte de éste) preferiblemente también tienen una avidez y afinidad y/o función efectora conferida o potenciada en células que expresan un antígeno diana, por ejemplo, un antígeno de cáncer, a una densidad de 30.000 a 20.000 moléculas/célula, a una densidad de 20.000 a 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 moléculas/célula o menos, a una densidad de 5000 moléculas/célula o menos, o a una densidad de 1000 moléculas/célula o menos. Las moléculas de la invención tienen utilidad particular para el tratamiento, prevención o manejo de una enfermedad o trastorno, como puede ser cáncer, en una subpoblación, en donde el antígeno diana se expresa a niveles bajos en la población de células diana.

Las moléculas de la invención también se pueden utilizar ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por el tratamiento o la prevención de enfermedades, como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. En una realización específica, las moléculas de la invención pueden utilizarse en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfocinas o factores de crecimiento hematopoyético (incluyendo por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con las moléculas y aumentan la respuesta inmunitaria. Las moléculas de la invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos utilizados para tratar una enfermedad, trastorno o infección incluyendo por ejemplo agentes contra el cáncer, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales, por ejemplo, como se indica en la sección 5.7.

5.6.1 CÁNCERES

En algunas realizaciones, la invención puede ser para el tratamiento o la prevención de cáncer en un individuo con polimorfismos de FcγR, como pueden ser aquellos que son homocigotos para los alelos 158V de FγRIIIA o 158F de FcγRIIIA. Puede manipularse por ingeniería al menos un dominio de unión a epítopo de la molécula de diacuerpo para unirse de manera inmunoespecífica a FcγRIIIA (158F). Puede manipularse por ingeniería al menos un dominio de unión a epítopo de la molécula de diacuerpo para unirse de manera inmunoespecífica a FcγRIIIA (158V).

La eficacia de la terapia convencional con anticuerpos monoclonales depende del polimorfismo del FcγR del individuo (Cartron *et al*. (2002) "*Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcRIIIa Gene*", Blood 99: 754-758; Weng *et al*. (2003) "*Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma*", J Clin Oncol. 21 (21):3940-3947). Estos receptores son expresados en la superficie de células efectoras y median en la ADCC. Los alelos de alta afinidad de los receptores activadores de baja afinidad, mejoran la capacidad de células efectoras para intervenir en la ADCC. Al contrario que la dependencia de las interacciones Fc-FcγR para efectuar la función efectora, los métodos de la invención abarcan la manipulación por ingeniería de moléculas para reconocer de manera inmunoespecífica los receptores activadores de baja afinidad, permitiendo que las moléculas sean diseñadas para un polimorfismo específico. Como alternativa, o además, la molécula de la invención puede manipularse por ingeniería para que comprenda un dominio Fc variante que presente afinidad potenciada para FcγR (respecto a un dominio Fc de tipo natural) en las células efectoras. Las moléculas manipuladas por ingeniería de la invención proporcionan mejores reactivos para inmunoterapia para tratar a pacientes, independientemente de su polimorfismo asociado al receptor FcγR.

Las moléculas de diacuerpo manipuladas por ingeniería de acuerdo con la invención se analizan por ADCC utilizando una línea celular cultivada o células PMBC derivadas del paciente para determinar la capacidad de las mutaciones Fc para potenciar la ADCC. La técnica ADCC convencional se realiza utilizando los métodos que se describen en el presente documento. Se recogen linfocitos de sangre periférica utilizando un gradiente Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células diana, es decir, las líneas celulares cultivadas o células derivadas del paciente, se cargan con europio (PerkinElmer) y se incuban con los efectores durante 4 horas a 37ºC. El europio liberado es detectado utilizando un lector de placas para fluorescencia (Wallac). Los datos del ADCC resultantes indican la eficacia de las moléculas de la invención para activar la citotoxicidad mediada por las células NK y establecer qué moléculas pueden ser analizadas con las muestras del paciente y monocitos elutriados. Las moléculas de diacuerpo que presenten el potencial más grande para desencadenar la actividad ADCC entonces se analizan en un ensayo ADCC utilizando las PBMC de los pacientes. Como células efectoras se utilizan células PBMC de donantes sanos.

Puede proporcionarse el prevenir o tratar cáncer, caracterizado por un antígeno de cáncer, manipulando por ingeniería la molécula de diacuerpo para que reconozca de manera inmunoespecífica el antígeno de cáncer, de modo que la molécula de diacuerpo sea por sí misma citotóxica (por ejemplo, mediante los reticulación de los receptores de superficie dando origen a apoptosis o regulación por disminución aumentada de señales proliferativas) y/o comprende un dominio Fc, de acuerdo con la invención, y/o media en una o más funciones efectoras (por ejemplo, ADCC, fagocitosis). Los diacuerpos que hayan sido manipulados por ingeniería de acuerdo con la invención son útiles para la prevención o tratamiento de cáncer, puesto que estos tienen una actividad citotóxica (por ejemplo, letalidad mejorada contra las células tumorales y/o citotoxicidad mejorada, por ejemplo, actividad ADCC o CDC mejorada).

Los cánceres asociados con un antígeno de cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un diacuerpo que se una a un antígeno de cáncer y sea citotóxico, y/o haya sido manipulado por ingeniería de acuerdo con los métodos de la invención para presentar una función efectora. Por ejemplo, pero no como limitación, los cánceres que se asocian con los siguientes antígenos de cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y las composiciones de la invención: antígeno de carcinoma KS 1/4 pan (Perez *et al*. (1989) "*Isolation And Characterization Of A Cdna Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker*", J. Immunol. 142:3662-3667; Moller *et al*. (1991) "*Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes*", Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al*. (1991) "*Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants*", Cancer Res. 51 (2):468-475), fosfatasa ácida prostática (Taylor *et al*. (1990) "*Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Fosfatasa Determined From A Full-Length cDNA Clone",* Nucl. Acids Res. 18(16):4928), antígeno específico de próstata (Henttu *et al*. (1989) "*cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes*", Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli *et al*. (1993) "*Molecular Cloning Of A Complementary ADN Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen*", Cancer Res. 53:227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin *et al*. (1989) "*Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97",* J. Natl. Cancer Instit. 81 (6):445-454), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl *et al*. (1990) "*The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product*" J. Exp. Med. 171 (4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al*. (1987) "*Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance",* Cancer 59:55-63; Mittelman *et al*. (1990) "*Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies*", J. Clin. Invest. 86:2136-2144)), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al*. (1995) "*Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotipo Antibody Vaccine",* J. Clin. Invest. 96(1):334-42), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulo de grasa de leche humana, antígenos asociados con tumor colorrectal como puede ser: CEA, TAG-72 (Yokota *et al*. (1992) "*Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms*", Cancer Res. 52:3402-3408), C017-1 A (Ragnhammar *et al*. (1993) "*Effect Of Monoclonal Antibody 17-1 A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma -Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced",* Int. J. Cancer 53:751 -758); GICA 19-9 (Herlyn *et al*. (1982) "*Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma*", J. Clin. Immunol. 2: 135-140), CTA-1 y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, CD19 (Ghetie *et al*. (1994) "*Anti-CDI9 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest*", Blood 83: 1329-1336), antígeno de linfoma B humano CD20 (Reff *et al*. (1994) "*Depletion OfB Cells In vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20*", Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros *et al*. (1993) "*Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody MI 95 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia*", J. Nucl. Med. 34:422-430), antígenos específicos de melanoma como puede ser gangliósido GD2 (Saleh *et al*. (1993) "*Generation Of A Human Antiidiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antígeno",* J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al*. (1993) "*A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities*", Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al*. (1994) "*Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside*", J. Clin. Oncol. 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al*. (1993) "*Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers*", Cancer Res. 53:5244-5250), tipo de antígeno de superficie celular de trasplante específico de tumor (TSTA) como puede ser los antígenos tumorales inducidos por virus incluyendo virus de ADN de tumor de antígeno T y antígenos de envoltura de virus de ARN de tumor, antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína, como puede ser CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom *et al*. (1985) "*Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas*", Cancer. Res. 45:2210-2188), antígeno de diferenciación, como puede ser el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom *et al*. (1986) "*Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma*", Cancer Res. 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al*. (1988) "*Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Abl, Ab2, and Ab3)*", J. Immunol. 141: 1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama como puede ser EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 ($p185^{HER2}$), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al*. (1992) "*Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property*", Trends in Biochem. Sci. 17:359-363), antígeno de linfocito humano maligno-APO-1 (Trauth *et al*. (1989) "*Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis*", Science 245:301-304), antígeno de diferenciación (Feizi (1985) "*Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens",* Nature 314:53-57) como pueden ser el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y endodermo primario, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos. M18 y M39 encontrados en epitelio mamario, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y $D_1$56-22 encontrados en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E_1 (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, Fc 10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en

adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor de EGF, (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T_5A_7 encontrado en células mieloides, R_{24} encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones en un estadío de 4-8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma de células T cutáneas (véase Edelson (1998) "*Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy*", Cancer J Sci Am. 4:62-71).

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse por los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: Leucemias incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas como puede ser leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucémicas y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas incluyendo pero sin limitarse a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas incluyendo pero sin limitarse a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples incluyendo pero sin limitarse a, mieloma indolente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammopatía monoclonal de significación indeterminada; gammopatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas de tejido óseo y conjuntivo, incluyendo pero sin limitarse a, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de células gigantes maligno, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales incluyendo, pero sin limitarse a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget, y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo, pero sin limitarse a, feocromocitoma y carcinoma corticosuprarrenal; cáncer de tiroides incluyendo pero sin limitarse a, cáncer tiroideo papilar o folicular, cáncer tiroideo medular y cáncer tiroideo anaplásico; cáncer de páncreas, incluyendo, pero sin limitarse a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o células del islote; cáncer hipofisario incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cáncer de ojos incluyendo, pero sin limitarse a, melanoma ocular como puede ser melanoma del iris, melanoma coroidal y melanoma de cuerpos ciliares y retinoblastoma; cánceres vaginales, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicouterinos incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres de útero incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma endometrial y sarcoma de útero; cánceres de ovario incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres esofágicos incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide cítico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres gástricos incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, de tipo fungante (polipoide), ulcerante, de propagación superficial, de propagación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas incluyendo, pero sin limitarse a, de tipo papilar, nodular y difuso; cáncer de pulmón incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres de testículo, incluyendo, pero sin limitarse a, de tipo tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, leiomiosarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres del pene; cánceres bucales incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de la piel incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de propagación superficial, melanoma nodular, melanoma léntigo maligno, melanoma lentiginoso acro; cánceres renales incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefroma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis y/o uréter renal); tumor de Wilms; cánceres de la vejiga incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, quistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para realizar una revisión de tales trastornos, véase Fishman *et al*. (1985) Medicine, 2ª ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia; y Murphy *et al*. (1997) Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Por consiguiente, las composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento o la prevención de diversos cánceres u otras enfermedades proliferativas anómalas, incluyendo (pero sin limitarse a) las siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata, cérvix, tiroides y piel; incluido el carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, como leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, como puede ser fibrosarcoma y rabdomioscarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, como pueden ser fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se considera que los cánceres ocasionados por aberraciones en apoptosis también serían tratados por los métodos y las composiciones de la invención. Tales cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores de mama, próstata y ovario dependientes de hormonas, y lesiones precancerosas, como pueden ser poliposis familiar adenomatosa, y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, el tumor maligno o cambios disproliferativos (como pueden ser metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos, son tratados o prevenidos con los métodos y las composiciones de la invención en el ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel, páncreas o útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, melanoma o la leucemia se tratan o previenen con los métodos y las composiciones de la invención.

En una realización específica, una molécula de la invención (por ejemplo, un diacuerpo que contenga múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste)) inhibe o disminuye el crecimiento de células cancerosas en al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% respecto al crecimiento de células cancerosas en ausencia de tal molécula de la invención.

En una realización específica, una molécula de la invención (por ejemplo, un diacuerpo que contenga múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste)) aniquila las células o inhibe o disminuye el crecimiento de células cancerosas en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 100% mejor que la molécula parenteral.

5.6.2 ENFERMEDAD AUTOINMUNITARIA Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden un dominio de unión a epítopo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante (o parte de éste), manipulado por ingeniería de conformidad con los métodos de la invención, dominio Fc que presenta mayor afinidad para FcγRIIB y afinidad disminuida para FcγRIIIA y/o FcγRIIA respecto al a dominio Fc de tipo natural. Las moléculas de la invención con tales características de unión son útiles para regular la respuesta inmunitaria, por ejemplo, para inhibir la respuesta inmunitaria en relación con enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias. Aunque no se pretende restringirse a ningún mecanismo de acción, las moléculas de la invención con una afinidad para FcγRIIB y/o que contienen un dominio Fc con afinidad aumentada para FcγRIIB y una afinidad disminuida para FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden conducir a atenuar la respuesta activadora frente a FCγR y la inhibición de la capacidad de respuesta celular, y así tienen eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmunitario.

La invención también proporciona los métodos para prevenir, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un individuo además consiste en, administrar al individuo una cantidad terapéutica o profiláctica de uno o más agentes antiinflamatorios. La invención también proporciona los métodos para la prevención, tratamiento o manejo de uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmunitaria además consisten en administrar al individuo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.7 proporciona los ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

Los ejemplos de las enfermedades autoinmunitarias que pueden ser tratadas administrando las moléculas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de las glándulas suprarrenales, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, esprúe celiaco-dermatitis, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunológica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de crioaglutininas, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis idiopática pulmonar, púrpura

trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta de tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o mediada por el sistema inmunitario, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómeno de Raynauld, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, como puede ser dermatitis vasculitis herpetiforme, vitíligo, y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Como se describe en el presente documento en la sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunitarios se asocian con un estado inflamatorio. Por tanto, existe un solapamiento entre lo que se considera un trastorno autoinmunitario y un trastorno inflamatorio. Por tanto, algunos trastornos autoinmunitarios también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de los trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o manejarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.

Las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión a epítopo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad potenciada para FcγRIIB y una afinidad disminuida para FcγRIIIA también pueden utilizarse para disminuir la inflamación que experimentan los animales, particularmente los mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, una molécula de la invención disminuye la inflamación en un animal en al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% respecto a la inflamación en un animal al que no se le haya administrado tal molécula.

Las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión a epítopo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con afinidad potenciada para FcγRIIB y afinidad disminuida para FcγRIIIA también pueden utilizarse para prevenir el rechazo de trasplantes.

5.6.3 ENFERMEDADES INFECCIOSAS

En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención son tóxicas para un agente infeccioso, potencian la respuesta inmunitaria contra tal agente o potencian la función efectora contra tal agente, en relación con la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse por las moléculas de la invención son ocasionadas por agentes infecciosos incluyendo, pero sin limitarse a, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

Las enfermedades virales que pueden tratarse o prevenirse empleando las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas ocasionadas por el virus de hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sinsicial respiratorio, papilomavirus, papovavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus de Coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, virus de la viruela, virus de Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II), y agentes de enfermedades virales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse empleando las moléculas de la invención, que son ocasionadas por bacterias incluyen, pero no se limitan a, micobacterias *Rickettsia*, micoplasma, *Neisseria*, *S. pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (carbunco), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacterias, tétanos, pertissus, cólera, plaga, *Difteria*, *Chlamydia*, *S. aureus* y *Legionella*.

Las enfermedades protozoarias que pueden tratarse o prevenirse empleando las moléculas de la invención, que son ocasionadas por protozoos incluyen, pero no se limitan a, *Leishmania*, *Kokzidioa*, *Tripanosoma* o malaria.

Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse empleando las moléculas de la invención, que son ocasionadas por parásitos incluyen, pero no se limitan a *Chlamydia* y *Rickettsia*.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión a epítopo específico para un agente infeccioso presentan una función efectora de anticuerpo hacia dicho agente, por ejemplo, una proteína patógena. Los ejemplos de agentes infecciosos incluyen, pero no se limitan a, bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Candida albicans, Proteus vulgaris, Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*), un patógeno (por ejemplo, papovavirus B-linfotrópico (PVL); *Bordatella pertussis*; virus de la enfermedad de Borna (VEB); coronavirus bovino;

virus de coriomeningitis; virus del dengue; un virus, *E. coli*; ébola; ecovirus 1; ecovirus-11 (EV); endotoxina (LPS); bacteria entérica; virus huérfano entérico; enterovirus; virus de leucemia felina; virus de la fiebre aftosa; virus de leucemia del mono gibón (VLMG); bacterias Gram-negativas; *Helicobacter pylori*; virus de la hepatitis B (VHB); virus del herpes simple; VIH-1; citomegalovirus humano; coronovirus humano; influenza A, B y C; *Legionella*; *Leishmania mexicana*; *Listeria monocytogenes*; virus del sarampión; meningococos; *Morbilivirus*; virus de la hepatitis de ratón; virus de leucemia murina; gammaherpesvirus murino; retrovirus murino; coronavirus murino, virus de la hepatitis de ratón; *Mycobacterium avium*-M; *Neisseria gonorrhoeae*; virus de la enfermedad de Newcastle; parvovirus B19; *Plasmodium falciparum*; poxvirus; *Pseudomonas*; rotavirus; *Salmonella typhimurium*; *Shigella*; estreptococos; virus linfotrópico de células T 1; virus Vaccinia).

5.6.4 DESTOXIFICACIÓN

En ciertas realizaciones, la unión de una molécula de la invención a la toxina (por ejemplo, una molécula de fármaco tóxica) disminuye o elimina el efecto fisiológico adverso de la toxina. En todavía otras realizaciones, la unión de un diacuerpo de la invención a la toxina aumenta o potencia la eliminación, degradación o neutralización de la toxina respecto a la eliminación, degradación o neutralización en ausencia de dicho diacuerpo. La inmunotoxicoterapia puede utilizarse para tratar sobredosis o exposición a fármacos incluyendo pero sin limitarse a, digoxina, PCP, cocaína, colchicina y antidepresivos tricíclicos.

5.7 TRATAMIENTO COMBINADO

El tratamiento puede comprender además la administración de las moléculas de la invención en combinación con otras terapias conocidas por los expertos en la técnica para el tratamiento o la prevención de cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa o intoxicación, incluyendo, pero sin limitarse a, quimioterapias experimentales y convencionales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, terapias de radiación o cirugía. Las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes, anticuerpos terapéuticos u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa o intoxicación.

Una o más moléculas de la invención pueden administrarse a un mamífero, preferiblemente un humano, de manera concurrente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer. El término “de manera concurrente” no está limitado a la administración de los agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino más bien se entiende que una molécula de la invención y el otro agente se administran a un mamífero en orden y dentro de un intervalo temporal de modo que la molécula de la invención pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio aumentado en comparación si estos fueron administrados de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse al mismo tiempo o de manera sucesiva en cualquier orden en diferentes puntos temporales; no obstante, si no se administran al mismo tiempo, estos deben administrarse de manera suficientemente próxima en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía apropiada. En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia. Pueden administrarse dos o más componentes durante la misma visita del paciente.

Los agentes profiláctico o terapéuticos pueden administrarse con aproximadamente de 2 a 4 días de diferencia, de aproximadamente 4 a 6 días de diferencia, con aproximadamente 1 semana de diferencia, con aproximadamente de 1 a 2 semanas de diferencia, o más de 2 semanas de diferencia. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse en un marco temporal cuando ambos agentes todavía son activos. Un experto en la técnica podrá determinar tal marco temporal determinando la semivida de los agentes administrados.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención pueden administrarse de manera cíclica a un individuo. La terapia cíclica consiste en la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguido por la administración de un segundo agente y/o un tercer agente durante un periodo de tiempo y repitiendo esta administración secuencial. La terapia cíclica puede disminuir la presentación de resistencia a una o más de las terapias, evitar o disminuir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o potenciar la eficacia del tratamiento.

Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, alrededor de una vez cada dos semanas, alrededor de una vez cada 10 días o alrededor de una vez cada

semana. Un ciclo puede consistir en la administración de un agente terapéutico o profiláctico por infusión durante alrededor de 90 minutos cada ciclo, alrededor de 1 hora cada ciclo, alrededor de 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede contener al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados será de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 12 ciclos, más comúnmente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 ciclos y más comúnmente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 ciclos.

Los agentes terapéuticos y profilácticos de la invención pueden administrarse en regímenes de dosificación metronómicos, por infusión continua o administración frecuente sin periodos de descanso prolongados. Tal administración metronómica puede implicar la dosificación en intervalos constantes sin periodos de descanso. Normalmente los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotócicos, se utilizan a menores dosis. Tales regímenes de dosificación comprenden la administración diaria prolongada de dosis relativamente bajas durante periodos de tiempo largos. En realizaciones preferidas, el uso de dosis menores puede llevar al mínimo los efectos secundarios tóxicos y eliminar los periodos de descanso. Los agentes terapéuticos y profilácticos pueden administrarse por infusión en dosis baja prolongada o continua que oscila entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 2 días, y aproximadamente 1 semana, y aproximadamente 2 semanas, y aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 1 mes y aproximadamente 2 meses, y aproximadamente 3 meses, y aproximadamente 4 meses, y aproximadamente 5 meses, y aproximadamente 6 meses. El programa de tales regímenes de dosificación puede ser optimizado por el oncólogo experto.

Los ciclos de tratamiento pueden administrarse de manera concurrente a un mamífero, es decir, dosis individuales de los agentes terapéuticos pueden administrarse por separado pero dentro de un intervalo temporal de modo que las moléculas de la invención puedan funcionar conjuntamente con el otro agente o agentes. Por ejemplo, un componente puede administrarse una vez a la semana en combinación con los demás componentes que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. Dicho de otro modo, los regímenes de dosificación para los agentes terapéuticos se llevan a cabo de manera concurrente aunque los agentes terapéuticos no se administren al mismo tiempo o durante la misma visita del paciente.

Como se utilizan en combinación con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, las moléculas de la invención y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar de manera aditiva o, más preferiblemente, de manera sinérgica. Puede administrarse una molécula de la invención de manera concurrente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. Puede administrarse una molécula de la invención de manera concurrente con uno o más agentes terapéuticos diferentes en composiciones farmacéuticas diferentes. Puede administrarse una molécula de la invención antes de o después de la administración de otro agente profilácticos o terapéuticos. La administración de una molécula de la invención puede ser en combinación con otros agentes profiláctico o terapéuticos por la misma vía de administración o diferentes, por ejemplo, oral y parenteral. Cuando una molécula de la invención se administra de manera concurrente con otro agente profiláctico o terapéutico que pueda producir efectos secundarios adversos incluyendo, pero sin limitarse a, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico puede administrarse ventajosamente a una dosis que se encuentre por debajo del umbral que desencadena el efecto secundario adverso.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de la administración que se proporcionan en el presente documento están abarcadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosificación y frecuencia variarán además por lo regular de acuerdo con factores específicos de cada paciente, dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos que se administren, la gravedad y tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y el historial médico anterior del paciente. Los regímenes apropiados puede seleccionarlos un experto en la técnica considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones notificadas en la bibliografía y recomendadas en Physician's Desk Reference (56ª ed., 2002).

5.7.1 AGENTES ANTICANCEROSOS

El tratamiento puede incluir la administración de una o más moléculas de la invención con uno o más agentes terapéuticos que se utilicen para el tratamiento y/o prevención de cáncer. Pueden administrarse inhibidores de angiogénesis combinados con las moléculas de la invención. Los inhibidores de la angiogénesis que pueden utilizarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina antiangiogénica III; Angiozyme; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartílago (CDI); CAI; fragmento de complemento CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; endostatina (fragmento XVIII de colágeno); fragmento de fibronectina; Gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento de hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); marimastat; inhibidores de metaloproteinasa (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023 A); MoAb IMC-1 C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de ribonucleasa placentaria; inhibidor del activador de plasminógeno; factor de plaquetas-4 (PF4); prinomastat; fragmento de 16 kDa de prolactina; proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; solimastat; escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; factor de crecimiento transformante beta (TGF-b); vasculostatina; vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474;

inhibidores de farnesil transferasa (FT1); y bisfosfonatos.

Los agentes anticancerosos que pueden utilizarse combinados con las moléculas de la invención, incluidas las composiciones farmacéuticas, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; acodazol clorhidrato; acronina; adozelesina; aldesleucina; aitretamina; ambomicina; ametantrona acetato; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; bisantreno clorhidrato; bisnafida dimesilato; bizelesina; bleomicina sulfato; brequinar sódico; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; carubicina clorhidrato; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crisnatol mesilato; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; daunorubicina clorhidrato; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; dezaguanina mesilato; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; doxorubicina clorhidrato; droloxifeno; droloxifeno citrato; dromostanolona propionato; duazomicina; edatrexato; eflornitina clorhidrato; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; epirubicina clorhidrato; erbulozol; esorubicina clorhidrato; estramustina; estramustina fosfato sódico; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; fadrozol clorhidrato; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; gemcitabina clorhidrato; hidroxiurea; idarubicina clorhidrato; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluida la interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-la; interferón gamma-lb; iproplatino; irinotecán clorhidrato; lanreotida acetato; letrozol; leuprolida acetato; liarozol clorhidrato; lometrexol sódico; lomustina; losoxantrona clorhidrato; masoprocol; maitansina; mecloretamina clorhidrato; megestrol acetato; melengestrol acetato; melfalano; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; mitoxantrona clorhidrato; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina sulfato; perfosfamida; pipobromano; piposulfano; piroxantrona clorhidrato; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; procarbazina clorhidrato; puromicina; puromicina clorhidrato; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; safingol clorhidrato; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina, espirogermanio clorhidrato; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; teloxantrona clorhidrato; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; toremifeno citrato; trestolona acetato; triciribina fosfato; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; tubulozol clorhidrato; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; vinblastina sulfato; vincristina sulfato; vindesina; vindesina sulfato; vinepidina sulfato; vinglicinato sulfato; vinleurosina sulfato; vinorelbina tartrato; vinrosidina sulfato; vinzolidina sulfato; vorozol; zeniplatino; zinostatina; zorubicina clorhidrato. Otros fármacos anticancerosos incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25-dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante 1; antiandrógenos, carcinoma de próstata; antiestrógenos; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; afidicolina glicinato; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de beta-lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidores de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafido; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; IL-2 de la viruela aviar; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; citarabina ocfosfato; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemnina B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5-azacitidina; 9-dihidrotaxol; dioxamicina; difenil-espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; fluorodaunorubicina clorhidrato; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texapirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexametilen-bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas del interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; lentinano sulfato; leptolstatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa leucocítico; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasa de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF;

mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario defectuoso; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina de factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A + sk de pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor 1 de tumores múltiples; agente anticanceroso de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular de micobacteria; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrulina; O6-benzilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetin A; placetin B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmunitario basado en la proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C; inhibidores de la proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno-hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de farnesil proteína transferasa ras; inhibidores de ras; inhibidores de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos antisentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión a antígeno de cadena sencilla; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamida; inhibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinán; hormona estimulante tiroidea; etiopurpurina de etilo y de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre pluripotenciales; inhibidores de la transducción: tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de urocinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia génica eritrocítica; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinixaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalámero de zinostatina. Fármacos anticancerosos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

Los ejemplos de los anticuerpos terapéuticos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un inmunosupresor, anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado para la prevención de rechazo de aloinjerto renal agudo; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a murino anti-antígeno de superficie celular 17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG anti-idiotipo (epítopo GD3) murino (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo anti-integrina $\alpha V\beta 3$ humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un anticuerpo IgG anti-CD3 humanizado (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor del complemento 5 (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNF-α humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF-α humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF-α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti-$\alpha 4\beta 7$ humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF-$\beta 2$ humano (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden utilizarse de acuerdo con la invención se presentan en la Tabla 8.

TABLA 8: Anticuerpos terapéuticos anticancerosos

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	receptor de EGF
AltaRex	OvaRex	Cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125

	BravaRex	Cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pemtumomab-itrio-90)	Cáncer de ovario	antígeno de PEM
	Therex	Cáncer de mama	antígeno de PEM
Boehringer Ingelheim	Bivatuzumab	Cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/ J&J	Panorex	Cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Accidente cerebrovascular isquémico	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	AcM idiotípico 105AD7	Vacuna contra el cáncer colorrectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	AcM, cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	NA
Genentech	Herceptin	Cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptin	Cáncer de mama en fase temprana	HER-2
	Rituxan	NHL grado bajo o folicular recidivante/ resistente al tratamiento	CD20
	Rituxan	NHL grado intermedio o alto	CD20
	AcM-VEGF	NSCLC, metastásico	VEGF
	AcM-VEGF	Cáncer colorrectal metastásico	VEGF
	AMD Fab	Degeneración macular relacionada con la edad	CD18
	E-26 (2ª gen. IgE)	Asma y rinitis alérgica	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + yttrium-90)	NHL de celulas B positivo para CD20, folicular de grado bajo, recidivante o resistente al tratamiento y NHL resistente al tratamiento para rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecán	carcinoma colorrectal resistente al tratamiento	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino y radiación	Cáncer de cabeza y cuello recién diagnosticado o recurrente	Receptor de EGF
	Cetuximab + gemcitabina	Carcinoma de páncreas metastásico recién diagnosticado	receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	Cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico	Receptor de EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas recién diagnosticado	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino	Cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local-regional incurable, extensa y metástasis distante)	Receptor de EGF
	Cetuximab + radiación	Carcinoma de cabeza y cuello local, avanzado	Receptor de EGF
	BEC2 + bacilo de Calmette-Guerin	Carcinoma de pulmón de células pequeñas	Miméticos gangliósido GD3
	BEC2 + bacilo de Calmette-Guerin	melanoma	Miméticos gangliósido GD3

	IMC-1C11	Cáncer colorrectal con metástasis en hígado	receptor del VEGF
ImmonoGen	nuC242-DM1	Cáncer colorrectal, gástrico y de páncreas	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	Linfoma no Hodgkin	CD22
	LymphoCide Y-90	Linfoma no Hodgkin	CD22
	CEA-Cide	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer colorrectal (obtención de radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de mama (obtención de radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de pulmón (obtención de radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Tumores intraoperatorios (obtención de radioimágenes)	CEA
	LeukoScan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	infección de tejido blando (obtención de radioimágenes)	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	linfoma (obtención de radioimágenes)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	Cánceres de células germinales de hígado 7 (obtención de radioimágenes)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+itrio-90)	Cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	Obtención de imágenes colorrectales	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	Cánceres de próstata y otros	CTLA-4
	MDX-210 (sobreexpresión de her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxin	Cáncer	$\alpha v \beta_3$
Merck KGaA	AcM 425	Cánceres diversos	Receptor de EGF
	IS-IL-2	Cánceres diversos	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	Leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotina-itrio 90)	Linfoma no Hodgkin	CD20
	Avidicina (albúmina + NRLU13)	Cáncer metastásico	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	Linfoma no Hodgkin	HLA-DR 10 beta
	Cotara (+ yodo-131)	Glioma maligno irresecable	Proteínas asociadas al ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina estafilocó-cica)	Cáncer de páncreas	NA

	AcM, cáncer de pulmón/ renal	Cáncer de pulmón y riñón	NA
	nacolomab tafenatox(C242 + enterotoxina estafilocócica)	Cáncer de colon y de páncreas	NA
Protein Design Labs	Nuvion	Tumores malignos de células T	CD3
	SMART ML 95	AML	CD33
	SMART 1 D10	NHL	antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	Cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	melanoma mestastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas	Gangliósido GD2
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	Cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	melanoma mestastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas	Gangliósido GD2
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 radiomarcado	Linfoma no Hodgkin	NA
	Monopharm C	Carcinoma colorrectal y de páncreas	antígeno SK-1
	GlioMAb-H (+toxina gelonina)	glioma, melanoma y neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan	NHL de grado bajo o folicular recidivante/ resistente al tratamiento	CD20
	Rituxan	NHL grado intermedio y alto	CD20
	ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

5.7.2 AGENTES INMUNOMODULADORES Y AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

Los ejemplos de los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimús)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimús), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloaminas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de los receptores de células T y moduladores de los receptores de citocina.

Los agentes antiinflamatorios han presentado resultados satisfactorios en tratamientos de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios y ahora son un tratamiento común y convencional de tales trastornos. Puede usarse cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos (los AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metil-xantinas. Los ejemplos de los AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCI™), ketoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxgenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de los agentes antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios junto con las moléculas de la invención se presenta en la Tabla 9, y un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios se presenta en la Tabla 10.

TABLA 9: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	LES
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/ Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	LES
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Enfermedad de Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectin	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Fact VII	Quimérico		Cencocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/ BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Accidente cerebrovascular
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/ Mitsubishi	Psoriasis
IDE-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharam/ Eisai	LES

IDE-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/ Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharam/ Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharama	Asma/alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Enfermedad de Crohn
LDP-01	Beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millenium Inc (LeucoSite Inc)	Accidente cerebrovascular
LDP-01	Beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millenium Inc (LeucoSite Inc)	Rechazo de aloinjerto
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millenium Inc (LeucoSite Inc)	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF-alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/ Centeon	Trastornos hematológicos autoinmunitarios
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/ Eisai/ genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmunitaria
OrthoClone/ anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
RepPro/ Abciximab	gpIIbIIIa	Quimérico	Fab	Centocor/ Lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhu Mab-E25	IgE	Humanizado	IgG2	Genentech/ Novartis/ Tanox Biosystems	Asma/alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		Glaxo SmithKline	Asma/alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		Glaxo SmithKline	Asma/alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/ Schering	Asma/alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmunitaria
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis

Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto

TABLA 10: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		Anticuerpo completamente humano derivado de xenoratón frente al antígeno CBL en células T, células B y células NK
5c8 (un antígeno anticuerpo anti-CD40)	Los estudios de fase II fueron interrumpidos en octubre 99, examinar “efectos adversos”	CD-40
IDEC 131	Lupus eritematosos sistémico (LES)	Anti-CD40 humanizado
IDEC 151	Artritis reumatoide	Primatizado; anti-CD4
IDEC 152	Asma	Primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	Primatizado; anti-CD80
MEDI-507	Artritis reumatoide; esclerosis múltiple; enfermedad de Crohn; psoriasis	Anti-CD2
LDP-02 (anti-B7 Acm)	Enfermedad inflamatoria del intestino Enfermedad de Crohn Colitis ulcerosa	Receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
SMART anticuerpo anti-interferón gamma	Enfermedad autoinmunitaria	Anti-interferón gamma
Verteporfin	Artritis reumatoide	
MDX-33	Trastornos de la sangre ocasionadas por reacciones autoinmunitarias Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) Anemia hemolítica autoinmunitaria	Anticuerpo monoclonal contra receptores de FcRI
MDX-CD4	Tratar artritis reumatoide y otra autoinmunidad	Anticuerpo monoclonal contra la molécula receptora de CD4
VX-497	Trastornos autoinmunitarios Esclerosis múltiple Artritis reumatoide Enfermedad inflamatoria del intestino Lupus Psoriasis	Inhibidor de inosina monofosfato deshidrogenasa (la enzima necesaria para preparar nuevo ARN y ADN que se utiliza en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	Artritis reumatoide	Inhibidor de ICE interleucina 1 beta (la enzima convertidora controla las rutas que conducen a una respuesta inmunitaria agresiva)
VX-745	Específico para la inflamación implicada en la señalización química del inicio de la respuesta inmunitaria y la progresión de la inflamación	Inhibidor de P38MAP cinasa, proteína cinasa activada por mitógeno
Enbrel (etanercept)		Selecciona como diana TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		Anticuerpo monoclonal completamente humano contra IL8 (interleucina 8)

Apogen MP4		Antígeno recombinante destruye selectivamente células T asociadas con la enfermedad, Induce la apoptosis; Las células T eliminadas por muerte celular programada ya no atacan las propias células del cuerpo; Apógenos específicos, células T específicas de la diana

5.7.3 AGENTES QUE SE UTILIZAN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Los antibióticos que pueden utilizarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozil (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxilo (Duricef®)), una claritromicina (por ejemplo, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (por ejemplo, eritromicina (EMycin®)), una penicilina (por ejemplo, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacino (Floxin®), ciprofloxacino (Cipro®) o norfloxacino (Noroxin®)), antibióticos aminoglicósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomiocina), antibióticos de tipo anfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol), antibióticos de tipo ansamicina (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefems (por ejemplo, loracarbef), carbapenems (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefems (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamcilina, yodhidrato de penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina y fencihicilina potásica), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona y cloruro de furazolio), quinolonas y análogos de estas (por ejemplo, cinoxacino, clinafloxacino, flumequina y grepagloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil-sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoyodo y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

Las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antimicóticos. Los agentes antimicóticos que pueden utilizare combinados con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrina, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofulvina.

Las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivirales. Los agentes antivirales útiles que pueden utilizarse combinados con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de proteasa, inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa inversa y análogos de nucleósido. Los ejemplos de los agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a, zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.8 TERAPIA CON VACUNA

La invención además abarca el uso de una composición de la invención para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente antigénico o inmunogénico, incluyendo, pero sin limitarse a, antígenos de cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas (de los que se describen ejemplos a continuación). Las composiciones de vacuna de la invención comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos frente a los que se desea una respuesta inmunitaria, en donde el uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos están recubiertos con un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad potenciada frente a FcγRIIIA. Las composiciones de vacuna de la invención son particularmente eficaces para desencadenar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora frente al agente antigénico o inmunogénico.

En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de vacuna de la invención comprende un virus contra el que se desea una respuesta inmunitaria. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos y preferiblemente están atenuados. La producción de los virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede realizarse utilizando los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. La invención

abarca una vacuna de virus recombinante vivo o una vacuna de virus recombinante inactivado que ha de ser formulada de acuerdo con la invención. La vacuna de virus vivos puede preferirse porque la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de clase y magnitud similares al que se produce en las infecciones naturales, y por tanto, confiere inmunidad considerable durante largo tiempo. La producción de tales formulaciones de vacuna de virus recombinantes, vivos puede lograrse utilizando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en el alantoides del embrión de pollo seguido por purificación.

En una realización específica, el virus recombinante es no patógeno para el individuo al que se le administra. En este sentido, el uso de virus manipulados por ingeniería genética para propósitos de vacuna puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, deleciones) en los moldes utilizados para transfección pueden proporcionar a los virus novedosos las características de atenuación. Por ejemplo, las mutaciones con cambio de sentido específicas que se asocian con sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío pueden prepararse en mutaciones por deleción. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles al frío o la temperatura y las frecuencias de inversión deben ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para manipular por ingeniería virus recombinante son conocidas en la técnica y están abarcadas por la invención. Por ejemplo, las técnicas para modificar por ingeniería virus de ARN de hebra negativa son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.166.057.

Como alternativa, es posible construir virus quiméricos con características “suicidas” para utilizarlos en las formulaciones de vacuna intradérmicas de la invención. Tales virus pasarán solo por una o unas pocas tandas de replicación dentro del huésped. Si se utiliza como vacuna, el virus recombinante pasará por ciclo(s) de replicación limitado(s) e inducirá un nivel de respuesta inmunitaria suficiente pero pasará más allá en el huésped humano ni ocasionará enfermedad. Como alternativa, pueden ser formulados virus inactivados (aniquilados) de acuerdo con la invención. Las formulaciones de vacunas de virus inactivados se pueden preparar empleando las técnicas convencionales para “aniquilar” los virus quiméricos. Las vacunas de virus inactivado son “aniquilados” en el sentido que se ha destruido su infectividad. De manera ideal, la infectividad del virus se destruye sin afectar a su inmunogenicidad. Con el fin de preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede hacerse crecer en cultivo celular o en el alantoides de embriones de pollo, se puede purificar mediante ultracentrifugación zonal, se inactiva con formaldehído o β-propiolactona y se combina.

En ciertas realizaciones, epítopos completamente foráneos, incluidos los antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales pueden manipularse por ingeniería en el virus para utilizarse en las formulaciones de vacuna intradérmica de la invención. Por ejemplo, los antígenos de virus no relacionados como VIH (gp160, gp120, gp41) antígenos de parásitos (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o micóticos o antígenos tumorales pueden manipularse por ingeniería para dar la cepa atenuada.

Prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga puede construirse en los virus quiméricos de la invención para utilizarlos en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Preferiblemente, las secuencias génicas heterólogas son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, los epítopos que inducen una respuesta inmunitaria protectora frente a cualquiera de una variedad de patógenos, o los antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes, pueden expresarse por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden construirse en virus quiméricos de la invención incluyen, pero no se limitan a, hemaglutinina neuraminidasa de influenza y parainfluenza y glicoproteínas de fusión como pueden ser los genes de HN y F de PIV3 humano. En todavía otra realización, secuencias génicas heterólogas que pueden manipularse por ingeniería en los virus quiméricos pueden ser aquellas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Los ejemplos de las proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero no se limitan a, citocinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimuladores de colonias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12, y antagonistas de estos agentes.

En las realizaciones alternativas, las composiciones de vacuna de la invención contienen un polipéptido de fusión, en donde un agente antigénico o inmunogénico está operativamente unido a un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad potenciada para FcγRIIIA. La manipulación por ingeniería de los polipéptidos de fusión para utilizarlos en las composiciones de vacuna de la invención se realiza utilizando los métodos de tecnología de ADN recombinante rutinarios y están dentro del nivel de conocimientos habituales.

Se describen métodos para inducir tolerancia en un individuo administrando una composición de la invención. Preferiblemente, una composición apropiada para inducir tolerancia en un individuo contiene un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante de la invención, en donde el anticuerpo variante tiene una mayor afinidad para FcγRIIB. Aunque no se pretende restringirse a un mecanismo de acción particular, tales composiciones son eficaces para inducir tolerancia activando la ruta inhibitoria mediada por FcγRIIB.

5.9 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención (es decir, diacuerpos) que comprenden múltiples dominios de unión a epítopo y, como opción, un dominio Fc (o parte de éste).

En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión, o una molécula conjugada, está sustancialmente purificada (es decir, sustancialmente libre de sustancias que limiten su efecto o produzcan efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el individuo es un animal, preferiblemente un mamífero, como puede ser un animal no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono, como puede ser un macaco cangrejero y un humano). En una realización preferida, el individuo es un humano. En todavía otra realización preferida, el anticuerpo de la invención es de la misma especie que el individuo.

Se conocen diferentes sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar una composición que comprende las moléculas de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al*. (1987) "*Receptor-Mediated In vitro Gene Transformation By A Soluble ADN Carrier System*" J. Biol. Chem. 262:4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos para administrar una molécula de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, las vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, la mucosa bucal, la mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes con actividad biológica. La administración puede ser sistémica o local. Además, también es posible emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y publicaciones PCT n.^{os} WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

La invención también propone que las moléculas de la invención sean envasadas en un envase herméticamente sellado, como puede ser una ampolla o un sobre que indique la cantidad del anticuerpo. En una realización, las moléculas de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado en seco o concentrado libre de agua en un envase sellado herméticamente y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para la administración a un individuo. Preferiblemente, las moléculas de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril, seco en un envase herméticamente sellado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, o al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la invención deben ser almacenadas a una temperatura entre 2 y 8ºC en su envase original y las moléculas deben administrarse en el transcurso de 12 horas, preferiblemente en el transcurso de 6 horas, en el transcurso de 5 horas, en el transcurso de 3 horas, o en el transcurso de 1 hora después de ser reconstituidas. En una realización alternativa, las moléculas de la invención son suministradas en forma líquida en un envase herméticamente sellado que indique la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de las moléculas de la invención se suministran en un envase herméticamente sellado con al menos 1 mg/ml, más preferiblemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz para el tratamiento, prevención o mejoría de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad del estado, y debe ser decidida de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden ser extrapoladas a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de pruebas *in vitro* o en modelos animales.

Para diacuerpos abarcados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, entre 0,0001 y 2 mg/kg, entre 0,0001 y 1 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, entre 0,0001 mg/kg y 0,25 mg/kg, entre 0,0001 y 0,15 mg/kg, entre 0,0001 y 0,10 mg/kg, entre 0,001 y 0,5 mg/kg, entre 0,01 y 0,25 mg/kg o entre 0,01 y 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación y frecuencia de administración de los diacuerpos de la invención se puede disminuir o alterar potenciando la captación y penetración de los diacuerpos en el tejido haciendo modificaciones incluyendo por ejemplo, lipidación.

La dosificación de las moléculas de la invención administradas a un paciente puede ser de desde 0,01 mg hasta 10000 mg/día si se utiliza como terapia de un solo agente. En otra realización las moléculas de la invención se utilizan combinadas con otras composiciones terapéuticas y las dosificaciones administradas a un paciente son menores que cuando se utilizan las moléculas como terapia de un solo agente.

Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no como limitación, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, como pueden ser membranas,

como las membranas Silastic, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una molécula de la invención, debe prestarse atención de utilizar materiales a los que no se absorba la molécula.

Las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) "*New Methods Of Drug Delivery*", Science 249: 1527-1533); Treat *et al*., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., págs. 3 17-327; véase, en general ibid.).

Las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o un sistema de liberación sostenida. Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica se puede utilizar para producir formulaciones de liberación sostenida que comprende una o más moléculas de la invención. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.526.938; publicación PCT WO 91/05548; publicación PCT WO 96/20698; Ning *et al*. (1996) "*Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel*", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al*. (1995) "*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions",* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al*. (1997) "*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam *et al*. (1997) "*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada una de las que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. En una realización, es posible utilizar una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, (1987) "*Implantable Pumps*", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald *et al*. (1980) "*Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis*", Surgery 88:507-516; y Saudek *et al*. (1989) "*A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery*", N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra realización, es posible utilizar materiales poliméricos para obtener liberación controlada de los anticuerpos (véase por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Levy *et al*. (1985) "*Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate*", Science 228: 190-192; During *et al*. (1989) "*Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In vivo Characterization",* Ann. Neurol. 25:351-356; Howard *et al*. (1989) "*Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits*", J. Neurosurg. 7(1): 105-112); patente estadounidense n.º 5.679.377; patente estadounidense n.º 5.916.597; patente estadounidense n.º 5.912.015; patente estadounidense n.º 5.989.463; patente estadounidense n.º 5.128.326; publicación PCT n.º WO 99/15154; y publicación PCT n.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros que se utilizan en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. En todavía otra realización, un sistema de liberación controlada se puede colocar en las proximidades de la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). En otra realización, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se utilizan de acuerdo con Dunn *et al*. (véase el documento U.S. 5.945.155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo a partir del sistema polimérico. La implantación puede producirse generalmente en cualquier parte dentro del cuerpo del paciente que necesite el tratamiento terapéutico. En otra realización, se utiliza un sistema de administración sostenida no polimérico, con lo que como sistema de administración del fármaco se utiliza un implante no polimérico en el cuerpo del individuo. Tras la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición hacia el fluido del tejido circundante y el material no polimérico poco a poco coagulará o precipitará para formar una matriz sólida, microporosa (véase el documento U.S. 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer (1990, "*New Methods Of Drug Delivery*", Science 249: 1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto se puede utilizar para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.526.938; publicaciones internacionales n.^{os} WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning *et al*. (1996) "*Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel* "Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, Song *et al*. (1995) *'Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions*", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al*. (1997) "*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam *et al*. (1997) "*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En una realización específica cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo de la invención, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para favorecer la expresión de su diacuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente estadounidense n.º 4.980.286), o por inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección o

administrándolo en unión a un péptido de tipo homeocaja que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al*. (1991) "*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868), etc. De manera alternativa, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión por recombinación homóloga.

El tratamiento de un individuo con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de moléculas de la invención puede incluir un solo tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. Un individuo puede tratarse con moléculas de la invención en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante alrededor de 4, 5 ó 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosificación eficaz de las moléculas utilizadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el ciclo del tratamiento específico.

5.9.1 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Se describen en el presente documento composiciones de fármaco a granel útiles para la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que sean apropiadas para la administración a un individuo o paciente) que pueden utilizarse en la preparación de formas farmacéuticas unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico dado a conocer en el presente documento o una combinación de estos agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también abarca las composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de diacuerpo de la invención y un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia normativa del Gobierno Federal o Estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra Farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles como agua y aceites incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, como puede ser aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y de glicerol también pueden ser empleadas como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos apropiados pueden ser almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

En general, los componentes de las composiciones de la invención son suministrados por separado o mezclados entre sí en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado, como puede ser una ampolla o un sobre que indique la cantidad del agente activo. Cuando la composición va a administrarse por infusión, esta puede dispensarse con un frasco de infusión que contenga el agua o solución salina de calidad farmacéutica, estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampolla de agua para inyección o solución salina estéril puede proporcionarse para que los componentes sean mezclados antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden ser formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aquellas formadas con aniones como las derivadas a partir de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes como las derivadas a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etcétera.

5.9.2 TERAPIA GÉNICA

Los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que codifican las moléculas de la invención pueden administrarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración

a un individuo de un ácido nucleico expresado o que puede expresarse. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o proteína de fusión que media en un efecto terapéutico o profiláctico.

De acuerdo con la presente invención es posible utilizar cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. A continuación se describen métodos a modo de ejemplo.

Para realizar revisiones generales de los métodos para terapia génica, véase Goldspiel *et al*. (1993) "*Human Gene Therapy*", Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu *et al*. (1991) "*Delivery Systems For Gene Therapy*", Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) "*Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions*", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "*The Basic Science Of Gene Therapy*" Science 260:926-932; y Morgan *et al*. (1993) "*Human Gene Therapy*", Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden utilizarse se describen en Ausubel *et al*. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual. Stockton Press, NY (1990).

Se describe una composición de la invención que comprende ácidos nucleicos que codifican un diacuerpo de la invención, formando parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped apropiado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante del anticuerpo, siendo tal promotor inducible o constitutivo, y, como opción, específico de tejido. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpos y otras secuencias deseadas cualesquiera están flanqueadas por regiones que fomentan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller *et al*. (1989) "*Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra *et al*. (1989) "*Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells*", Nature 342:435-438).

Una composición de la invención puede comprender ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, formando parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un huésped apropiado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante de una proteína de fusión, siendo tal promotor inducible o constitutivo, y como opción, específico de tejido. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y otras secuencias deseadas cualesquiera están flanqueadas por regiones que favorecen la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

La administración de los ácidos nucleicos en el individuo puede ser directa, en cuyo caso el individuo es expuesto directamente al ácido nucleico o vectores portadores del ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células primero son transformadas con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan al individuo. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden administrarse directamente *in vivo*, cuando estas se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede llevar a cabo por cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo para que se vuelva intracelular, por ejemplo, por infección utilizando vectores retrovirales defectuosos o atenuados u otros vectores virales (véase la patente estadounidense n.º 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en unión a un péptido que se conozca que entra en el núcleo, administrándolo en unión a un antígeno sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al*. (1987) "*Receptor-Mediated In vitro Gene Transformation By A Soluble ADN Carrier System*", J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que puede utilizarse para elegir tipos de células que expresen específicamente los receptores), etc. Pueden formarse complejos ácido nucleico-antígeno en los que el antígeno comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. Puede seleccionarse como diana el ácido nucleico *in vivo* para la captación y expresión específica de célula, seleccionando como diana un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221). De manera alternativa, el ácido nucleico puede introducirse de manera intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, por recombinación homóloga (Koller *et al*. (1989) "*Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra *et al*. (1989) "*Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells*", Nature 342:435-438).

Pueden usarse vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de la invención (por ejemplo, un diacuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, es posible utilizar un vector retroviral

(véase Miller *et al*. (1993) "*Use Of Retroviral Vectors For Gene Transfer And Expression",* Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma viral e integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que va a utilizarse en terapia génica son clonadas en uno o más vectores, lo que facilita el suministro de la secuencia de nucleótido a un individuo. Más detalles acerca de los vectores retrovirales se pueden encontrar en Boesen *et al*. (1993) "*Circumvention Of Chemotherapy-Induced Myelosuppression By Transfer Of The Mdr1 Gene*", Biotherapy 6:291 -302), que describen el uso de un vector retroviral para suministrar el gen mdr 1 a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer a las células madre más resistentes a quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes *et al*. (1994) "*Long-Term Biological Response Of Injured Rat Carotid Artery Seeded With Smooth Muscle Cells Expressing Retrovirally Introduced Human Genes*", J. Clin. Invest. 93:644-651; Keim *et al*. (1994) "*Retrovirus-Mediated Gene Transduction Into Canine Peripheral Blood Repopulating Cells",* Blood 83: 1467-1473; Salmons *et al*. (1993) "*Targeting Of Retroviral Vectors For Gene Therapy*", Human Gene Therapy 4: 129-141; y Grossman *et al*. (1993) "*Retroviruses: Delivery Vehicle To The Liver*", Curr. Opin. Genetics and Devel. 3: 110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden utilizarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus naturalmente infectan los epitelios respiratorios en los que provocan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de suministro a base de virus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no estén en división. Kozarsky *et al*. (1993, "*Gene Therapy: Adenovirus Vectors*", Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al*. (1994, "*Lung Gene Therapy: In vivo Adenovirus-Mediated Gene Transfer To Rhesus Monkey Airway Epithelium*", Human Gene Therapy, 5:3-10) demostraron el uso de vectores adenovirales para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos de uso de adenovirus en terapia gécnica se pueden encontrar en Rosenfeld *et al*. (1991) "*Adenovirus-Mediated Transfer Of A Recombinant Alpha 1-Antitrypsin Gene To The Lung Epithelium In vivo*", Science 252:431-434; Rosenfeld *et al*. (1992) "*In vivo Transfer Of The Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene To The Airway Epithelium*" Cell 68: 143-155; Mastrangeli *et al*. (1993) "*Diversity Of Airway Epithelial Cell Targets For In vivo Recombinant Adenovirus-Mediated Gene Transfer*", J. Clin. Invest. 91:225-234; publicación PCT WO 94/12649; y Wang *et al*. (1995) "*A Packaging Cell Line For Propagation Of Recombinant Adenovirus Vectors Containing Two Lethal Gene-Region Deletions*", Gene Therapy 2:775-783. En una realización preferida, se utilizan vectores adenovirales.

También se han propuesto virus adenoasociados (AAV) para utilizarlos en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh *et al*. (1993) "*Gene Therapy For Human Hemoglobinopathies*", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 y patente estadounidense n.º 5.436.146).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células de un cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células luego se siembran bajo selección para aislar aquellas células que hayan captado y estén expresando el gen transferido. Estas células después son suministradas a un individuo.

El ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido incluyendo, pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago, que contenga las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Numerosas técnicas son conocidas en la técnica para la introducción de genes foráneos en las células (véase, por ejemplo, Loeffler *et al*. (1993) "*Gene Transfer Into Primary And Established Mammalian Cell Lines With Lipopolyamine-Coated ADN*", Meth. Enzymol. 217:599-618, Cotten *et al*. (1993) "*Receptor-Mediated Transport Of ADN Into Eukaryotic Cells*", Meth. Enzymol. 217:618-644) y pueden utilizarse, con la condición de que no se alteren las funciones necesarias para el desarrollo y fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico pueda expresarse por la célula y preferiblemente pueda ser heredado y expresado por su progenie de células.

Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un individuo por diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, las células madre o progenitoras hematopoyéticas) preferiblemente pueden administrarse por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

Las células en las que se puede introducir el ácido nucleico para propósitos de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula deseado, disponible e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, como las que se obtienen a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etcétera.

La célula que se utiliza para terapia génica puede ser autóloga para el individuo.

Cuando se utilizan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión se introducen en las células de modo que éstas se puedan expresar por las células o su progenie, y las células recombinantes entonces pueden administrarse *in vivo* para un efecto terapéutico. Pueden usarse células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que se pueda aislar y mantener *in vitro* potencialmente puede utilizarse (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple *et al*. (1992) "*Isolation Of A Stem Cell For Neurons And Glia From The Mammalian Neural Crest*", Cell 7 1:973-985; Rheinwald (1980) "*Serial Cultivation Of Normal Human Epidermal Keratinocytes*", Meth. Cell Bio. 21 A:229-254; y Pittelkow *et al* (1986) "*New Techniques For The In vitro Culture Of Human Skin Keratinocytes And Perspectives On Their Use For Grafting Of Patients With Extensive Burns*", Mayo Clinic Proc. 61:771-777).

El ácido nucleico que va a introducirse con propósitos de terapia génica puede comprender un promotor inducible operativamente unido a la región codificante, de modo que pueda controlarse la expresión del ácido nucleico controlando la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

5.9.3 KITS

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenados con las moléculas de la invención. Además, uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden estar incluidos en el paquete o kit farmacéutico. Se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenados con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Como opción, asociado con tal(es) envase(s) puede estar un prospecto en la forma prescrita por una agencia normativa que regule la fabricación, el uso o la venta de los productos farmacéuticos o biológicos, prospecto que refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración a seres humanos.

Pueden utilizarse kits que en los métodos anteriores. Un kit puede comprender una o más moléculas de la invención. Un kit puede comprender además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento de cáncer en uno o más envases. Un kit puede comprender además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos de cáncer asociados con el cáncer. El otro agente profiláctico o terapéutico puede ser un agente quimioterápico. El agente profiláctico o terapéutico puede ser un agente terapéutico biológico u hormonal.

5.10 CARACTERIZACIÓN Y DEMOSTRACIÓN DE LA UTILIDAD TERAPÉUTICA

Diversos aspectos de las composiciones farmacéuticas, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención, preferiblemente se someten a prueba *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo de modelo animal, como puede ser un sistema de modelo animal de roedor, para determinar la actividad terapéutica deseada antes de utilizarlos en humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden utilizarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica es la deseada incluyen ensayos en cultivos celulares en los que una muestra de tejido del paciente se hace crecer en cultivo, y se expone a o se pone en contacto de otro modo con una composición farmacéutica de la invención, y se observa el efecto de tal composición en la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse por biopsia del paciente. Esta prueba permite realizar la identificación de la(s) molécula(s) profiláctica(s) o terapéutica(s) más eficaces para cada paciente. Pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de los tipos de células implicados en un trastorno autoinmunitario inflamatorio (por ejemplo, células T), para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado en tales tipos de células.

Pueden someterse a prueba combinaciones de los agentes profilácticos y/o terapéuticos en sistemas de modelos animales apropiados antes de su uso en humanos. Tal sistema de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Cualquier sistema animal bien conocido en la técnica puede utilizarse. Pueden someterse a prueba combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo de ratón. Tales sistemas modelo se utilizan ampliamente y son bien conocidos por un trabajador experto. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse en dosis repetidas. Algunos aspectos del procedimiento pueden variar. Tales aspectos pueden ser el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos y si tales agentes pueden administrarse por separado o como una mezcla.

Los modelos animales preferidos que se utilizan en los métodos son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresen los FcγR humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, puede utilizarse cualquier modelo de ratón descrito en la patente estadounidense 5.877.396. Los ratones transgénicos que se utilizan en los métodos incluyen, pero no se limitan a, ratones que portan FcγRIIIA humano; ratones que portan FcγRIIA humano; ratones que portan FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones que portan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano. Preferiblemente, las mutaciones que muestren los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos en lo anterior se someterán a prueba para utilizarlas en estudios en modelos animales antes de su uso en humanos. Pueden prepararse cantidades suficientes de anticuerpos para utilizarlos en modelos animales empleando los métodos

descritos anteriormente, por ejemplo utilizando sistemas de expresión de mamífero y métodos de purificación descritos y ejemplificados en el presente documento.

Pueden utilizarse modelos de xenoinjerto de ratón para examinar la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra una diana específica de tumor basándose en la afinidad y especificidad de los dominios de unión a epítopo de las moléculas de diacuerpo de la invención y la capacidad del diacuerpo para desencadenar una respuesta inmunitaria (Wu *et al*. (2001) "*Mouse Models For Multistep Tumorigenesis*", Trends Cell Biol. 11: S2-9). Ratones transgénicos que expresen los FcγR humanos en células efectoras de ratón son únicos y son modelos animales diseñados para someter a prueba la eficacia de las interacciones Fc-FcγR humanos. Pares de líneas de ratones transgénicos FcγRIIIA, FcγRIIIB y FcγRIIA generados en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (mediante un acuerdo de licencia con Rockefeller U. y Sloan Kettering Cancer center) pueden utilizarse como los enumerados en la Tabla 11 siguiente.

TABLA 11: Cepas de ratones

Antecedente de la cepa	FcR humano
Desnudo / KO CD16A	Ninguno
Desnudo / KO CD16A	FcγRIIIA
Desnudo / KO CD16A	FcγR IIA
Desnudo / KO CD16A	FcγR IIA y IIIA
Desnudo / KO CD32B	Ninguno
Desnudo / KO CD32B	FcγR IIB

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invención puede determinarse empleando diversos modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L. "*Arthritis and Autoimmunity in Animals*", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al*. (eds.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). Modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias también se pueden utilizar para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invención. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.

Los modelos animales principales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica se utilizan ampliamente e incluyen: modelos de rata de artritis inducida por adyuvante, modelos de rata y ratón de artritis inducida por colágeno y modelos de rata, conejo y hámster de artritis inducida por antígeno, todos descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L. "*Arthritis and Autoimmunity in Animals*", en Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al*. (eds.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invención puede evaluarse utilizando un modelo de rata de artritis inducida por carragenanos. La artritis inducida por carragenanostambién se ha utilizado en conejo, perro y cerdo en estudios de artritis o inflamación crónicas. Para determinar la eficacia terapéutica se utiliza la evaluación histomorfométrica cuantitativa. Los métodos para utilizar tal modelo de artritis inducida por carragenanos se describen en Hansra P. *et al*. (2000) "*Carrageenan-induced Arthritis In The Rat",* Inflammation, 24(2): 141-155. También se utilizan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano como se sabe y se describe en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invención también se pueden evaluar midiendo la inhibición del edema de la pata inducida por carragenanos en la rata, empleando una modificación del método descrito en Winter C. A. *et al*. (1962) "*Carrageenan-induced Edema In Hind Paw Of The Rat As An Assay For Anti-Inflammatory Drugs*" Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 544-547. Este ensayo ha sido utilizado como examen *in vivo* primario para la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE y se considera predictivo de la eficacia en humanos. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos a ensayar se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento del peso de la pata trasera del grupo a ensayar respecto al grupo control dosificado con vehículo.

Además, se pueden utilizar modelos animales para la enfermedad inflamatoria del intestino para evaluar la eficacia de las terapias combinadas de la invención (Kim *et al*. (1992) "*Experimental Colitis In Animal Models",* Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober (1985) "*Animal Models Of Inflammatory Bowel Disease An Overview*", Dig. Dis. Sci. 30(12 Supl.):3S-10S). La colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humanas que pueden ser inducidas en animales. Los polisacáridos sulfatados incluyendo pero sin limitarse a, amilopectina, carragenanos, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos incluyendo pero sin limitarse a, ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a animales por vía oral para

inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

También pueden utilizarse modelos animales para trastornos autoinmunitarios para evaluar la eficacia de las terapias combinadas de la invención. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunitarios como diabetes tipo 1, autoinmunidad de la tiroides, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders *et al*. (1999) "*Prevention Of Type 1 Diabetes From Laboratory To Public Health*", Autoimmunity 29:235-246; Rasmussen *et al*. (1999) "*Models To Study The Pathogenesis Of Thyroid Autoimmunity*", Biochimie 81:511-515; Foster (1999) "*Relevance Of Systemic Lupus Erythematosus Nephritis Animal Models To Human Disease*", Semin. Nephrol. 19: 12-24).

Además, es posible utilizar cualquiera de los ensayos conocidos por los expertos en la técnica con el fin de evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas dadas a conocer en el presente documento para enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL_{50}/DE_{50}. Se prefieren agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten índices terapéuticos grandes. Aunque es posible utilizar agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten efectos secundarios tóxicos, debe prestarse atención para diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio del tejido afectado con el fin de llevar al mínimo el daño potencial a las células no infectadas y, con ello, disminuir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos en cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para utilizarlos en humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración que se utilice. Para cualquier agente utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos en cultivo celular. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para obtener un intervalo de concentraciones en plasma circulantes que incluyan la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto a ensayar que obtenga una inhibición semi-máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en humanos. Es posible medir niveles en plasma, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alta resolución.

La actividad anticancerígena de las terapias utilizadas de acuerdo con la presente invención también se puede determinar empleando diversos modelos animales experimentales para el estudio de cáncer, como puede ser el modelo de ratón SCID o ratón transgénico o ratón desnudo con xenoinjertos humanos, modelos animales como hámsteres, conejos, etc., conocidos en la técnica y descritos en Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, eds. Fiebig and Burger); Contribuciones to Oncology (1999, arger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher).

Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de las moléculas de la invención son modelos de xenoinjerto de ratón. Las líneas celulares tumorales que pueden utilizarse para obtener tumores para el xenoinjerto incluyen, pero no se limitan a, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivarse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen receptores de erbB2 y prolactina. Las células SKBR3 han sido utilizadas rutinariamente en la técnica como modelos tumorales de ADCC y xenoinjerto. Como alternativa, se pueden utilizar células OVCAR3 derivadas de adenocarcinoma de ovario humano como fuente para tumores de xenoinjerto.

Los protocolos y las composiciones de la invención preferiblemente se someten a prueba *in vitro*, y luego *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de utilizarlos en humanos. Los agentes y los métodos terapéuticos pueden ser examinados utilizando células de una línea celular tumoral o maligna. Se pueden utilizar múltiples ensayos convencionales en la técnica para evaluar tal supervivencia y/o el crecimiento; por ejemplo, la proliferación de células se puede someter a ensayo midiendo la incorporación de ^{3}H-timidina, por recuento directo de células, detectando los cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos como pueden ser los protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante tinción con azul trípano, la diferenciación se puede evaluar visualmente basándose en los cambios en la morfología, disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de redes tubulares en membrana basal tridimensional o la preparación de la matriz extracelular, etcétera.

Los compuestos para utilizarlos en terapia pueden someterse a prueba en sistemas de modelos animales apropiados antes de someterlos a prueba en humanos, incluyendo, pero no se limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales antes descritos. Los compuestos pueden utilizarse luego en ensayos clínicos apropiados.

Más aún, puede utilizarse cualquiera de los ensayos conocidos por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas que se dan a conocer en el presente documento para el tratamiento o la prevención de cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmunitaria.

6. Ejemplos

6.1 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

Se construyeron un diacuerpo covalente monoespecífico y un diacuerpo covalente biespecífico para evaluar las características de producción recombinante, purificación y unión de cada uno. Las moléculas de diacuerpo purificadas por afinidad que se produjeron por los sistemas de expresión recombinante descritos en el presente documento se encontró mediante análisis de SDS-PAGE y SEC que consistían en especies diméricas simples. Los análisis de ELISA y SPR además revelaron que el diacuerpo biespecífico covalente presentó afinidad para ambos antígenos diana y pudo unirse a ambos antígenos al mismo tiempo.

Materiales y métodos:

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir cuatro constructos polipeptídicos representados esquemáticamente en la figura 2. El constructo 1 (ID SEC NO: 9) estaba compuesto por el dominio VL del anticuerpo 2B6 humanizado, que reconoce FcγRIIB, y el dominio VH del anticuerpo 3G8 humanizado que reconoce FcγRIIIA. El constructo 2 (ID SEC NO: 11) estaba compuesto por el dominio VL del anticuerpo Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6. El constructo 3 (ID SEC NO: 12) estaba compuesto por el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8. El constructo 4 (ID SEC NO: 13) estaba compuesto por el dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6.

PCR y construcción del vector de expresión: Las secuencias codificantes de los dominios VL y VH se amplificaron a partir del ADN molde utilizando cebadores directos e inversos diseñados para que los productos iniciales de PCR contuvieran secuencias solapantes, permitiendo que la PCR solapante generara las secuencias codificantes de los constructos polipeptídicos deseados.

Amplificación inicial por PCR del ADN molde: Aproximadamente 35 ng del ADN molde, por ejemplo, la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de interés; 1 µl de cebadores directos e inversos 10 uM, 2,5 µl de tampón 10x pfuUltra (Stratagene, Inc.); 1 µl de dNTP 10 mM; 1 µl de 2,5 unidades/µl de ADN polimerasa pfuUltra (Stratagene, Inc.); y agua destilada hasta un volumen total de 25 µl se mezclaron suavemente en un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron brevemente en una microcentrífuga para recoger la mezcla de reacción en el fondo del tubo. Se realizaron las reacciones de PCR utilizando el sistema de PCR GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystem) y los siguientes parámetros: 94ºC, 2 minutos; 25 ciclos de 94ºC, cada uno de 15 segundos; 58ºC, 30 segundos; y 72ºC, 1 minuto.

El dominio VL del anticuerpo Hu2B6 se amplificó a partir de cadena ligera del anticuerpo Hu2B6 empleando cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 56, respectivamente. El dominio VH del anticuerpo Hu2B6 se amplificó a partir de cadena pesada del anticuerpo Hu2B6 empleando cebadores directo e inverso ID SEC NO: 57 e ID SEC NO: 58, respectivamente. El dominio VL del anticuerpo Hu3G8 se amplificó a partir de cadena ligera del anticuerpo Hu3G8 empleando los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 59, respectivamente. El dominio VH de Hu3G8 se amplificó a partir de cadena pesada de Hu3G8 empleando cebadores directo e inverso ID SEC NO: 60 e ID SEC NO: 61, respectivamente.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 120 voltios. Los productos de PCR fueron cortados del gel y purificados empleando el kit de extracción MinElute GE1 (Qiagen, Inc.).

PCR solapante: Los productos iniciales de PCR fueron combinados como se describe más adelante y amplificados empleando las mismas condiciones de PCR descritas para la amplificación del ADN molde. Los productos de PCR solapante también se purificaron como se describió anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo 1, ID SEC NO: 9 (mostrado esquemáticamente en la figura 2), se amplificó combinando los productos de PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu3G8, y los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 61, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo 2, ID SEC NO: 11 (mostrado esquemáticamente en la figura 2), se amplificó combinando los productos de PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6, y los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 58, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo 3, ID SEC NO: 12 (mostrado esquemáticamente en la figura 2), se amplificó combinando los productos de PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8, y los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 61, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo 4, ID SEC NO: 13 (mostrado esquemáticamente en la figura 2), se amplificó combinando los productos de PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6, y los cebadores directo e inverso

ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 58, respectivamente.

Los cebadores directos de los dominios VL (es decir, ID SEC NO: 55) y los cebadores inversos de los dominios VH (es decir, ID SEC NO: 58 e ID SEC NO: 61) contenían sitios de restricción únicos para permitir la clonación del producto final en un vector de expresión. Los productos de PCR solapante purificados fueron digeridos con endonucleasas de restricción Nhe I y EcoR I, y fueron clonados en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.). Los plásmidos que codifican los constructos fueron diseñados como se identifica en la Tabla 12:

TABLA 12. CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS

Constructo codificante	Designación del plásmido	Inserto
1	pMGX0669	hu2B6VL-hu3G8VH
2	pMGX0667	hu3G8VL-hu2B6VH
3	pMGX0666	hu3G8VL-hu3G8VH
4	pMGX0668	hu2B6VL-hu2B6VH

Expresión del polipéptido/diacuerpo: pMGX0669, que codifica el constructo 1, se cotransfectó con pMGX0667, que codifica el constructo 2, en células HEK-293 empleando Lipofectamine 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para dirigir la expresión de un diacuerpo biespecífico covalente (CBD) inmunoespecífico para FcγRIIB y FcγRIIIA (el diacuerpo h2B6-h3G8). pMGX0666 y pMGX0668, que codifican los constructos 3 y 4, respectivamente, se cotransfectaron por separado en células HEK-293 para la expresión de un diacuerpo monoespecífico covalente (CMD), inmunoespecífico para FcγRIIIA (el diacuerpo h3G8) y FcγRIIB (el diacuerpo h2B6), respectivamente. Después de tres días en cultivo, los productos secretados se purificaron del medio condicionado.

Purificación: Los diacuerpos fueron capturados del medio condicionado empleando los antígenos pertinentes acoplados a Sepharose 4B activada con CNBr. La resina de Sepharose para afinidad se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de cargarla. Después de realizar la carga, se lavó la resina con tampón de equilibrado antes de llevar a cabo la elución. Se eluyeron los diacuerpos de la resina lavada empleando glicina 50 mM pH 3,0. Los diacuerpos eluidos fueron inmediatamente neutralizados con Tris/HCl 1 M pH 8,0 y concentrados empleando un concentrador del tipo de centrifugación. Los diacuerpos concentrados fueron además purificados por cromatografía de exclusión molecular empleando una columna Superdex 200 equilibrada en PBS.

SEC: La cromatografía de exclusión molecular se utilizó para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de los diacuerpos eluidos de la columna. El análisis de SEC se realizó en una columna Superdex 200HR 10/30 de GE Healthcare equilibrada con PBS. Para la comparación se utilizaron como controles los perfiles de elución de una IgG de longitud completa (~150 kDa), un fragmento Fab (~50 kDa) y un Fv monocatenario (~30 kDa)).

ELISA: La unión de los diacuerpos eluidos y purificados se caracterizó por el ensayo ELISA, como se describe en 5.4.2. 50 µl/pocillo de una disolución 2 µg/ml de sCD32B-Ig fueron recubiertos en una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón carbonato a 4ºC durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1%) y se bloqueó con BSA al 0,5% en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, el CBD h2B6-h3G8, el CMD h2B6 o el CMD h3G8 fueron diluidos en el tampón de bloqueo en una serie de diluciones dobles para generar un intervalo de concentraciones de diacuerpos, desde 0,5 µg/ml hasta 0,001 µg/ml. La placa después fue incubada a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 µl/pocillo de sCD16A-biotina 0,2 µg/ml a cada pocillo. La placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se utilizó para la detección 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech). El conjugado HRP-estreptavidina se permitió incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló empleado 80 µl/pocillo de sustrato TMB. Después de una incubación de 10 minutos, la reacción HRP-TMB se detuvo añadiendo 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1%. Se leyó la DO450 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax, y los resultados se representaron gráficamente empleando el software GraphPadPrism 3.03.

Ensayo BIAcore: Los parámetros cinéticos de la unión de los diacuerpos eluidos y purificados fueron analizados empleando un ensayo BIAcore (BIAcore Instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.) y el software asociado como se describe en la sección 5.4.3.

Se inmovilizaron sCD16A, sCD32B o sCD32A (control negativo) en una de las cuatro celdas de flujo (la celda de flujo 2) de una superficie de un chip sensor mediante química de acoplamiento de aminas (por modificación de los grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de modo que en la superficie se inmovilizaron aproximadamente 1000 unidades de respuesta (RU) de cualquier receptor. Después de esto, los ésteres reactivos que no reaccionaron fueron “desprotegidos” con una inyección de Et-NH2 1 M. Una vez que se preparó la superficie apropiada, se

hicieron pasar diacuerpos biespecíficos covalentes (el CBD h2B6-h3G8) o los diacuerpos monoespecíficos covalentes (el CMD h2B6 o el CMB h3G8) sobre la superficie mediante inyecciones de 180 segundos de una disolución 6,25-200 nM a una velocidad de flujo de 70 ml/min. Para realizar una comparación también se sometió a prueba el fragmento scFV de h3G8.

Una vez que se recopiló toda una serie de datos, las curvas de unión resultantes se ajustaron de manera global utilizando algoritmos informáticos proporcionados por el proveedor, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan las constantes K_{on} y K_{off}, a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_D como la razón de las dos constantes de velocidad, es decir, (es decir, K_{off}/K_{on}). Tratamientos más detallados de cómo se derivan cada una de las constantes de velocidad se pueden encontrar en el manual del software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las fases de asociación y disociación (K_{off}/K_{on}) se ajustaron por separado. La constante de la velocidad de disociación se obtuvo para el intervalo de 32-34 s de la fase de disociación de 180 s; el ajuste de la fase de asociación se obtuvo mediante un modelo de Langmuir 1:1 y se eligió el ajuste de base de acuerdo con los criterios R_{max} y chi^2 para los diacuerpos biespecíficos y el fragmento scFv; para la unión del CMD se utilizó un ajuste de analito bivalente.

Resultados

El análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras reveló que el producto purificado de los sistemas de expresión de CMD h3G8, CMD h2B6 y CBD h2B6-h3G8 cada uno fue una sola especie con un peso molecular estimado de aproximadamente 50 kDa (figura 3, carriles 4, 5 y 6, respectivamente). En condiciones reductoras, el producto purificado de cualquiera de los sistemas de expresión de CMD corrió como una sola banda (las carriles 1 y 2), mientras que el producto purificado a partir del sistema de CBD h2B6-h3G8 fue revelado como 2 proteínas diferentes (figura 3, carril 3). Todos los polipéptidos purificados a partir del sistema de expresión y visualizados por SDS-PAGE en condiciones reductoras migraron a aproximadamente 28 kDa.

El análisis de SEC de cada uno de los productos del sistema de expresión también reveló una sola especie molecular (figura 4B), que eluyó cada una en aproximadamente el mismo tiempo que un fragmento Fab de la IgG (~50 kDa) (figura 4A). Los resultados indican que el producto purificado por afinidad fue un dímero covalente homogéneo para el caso del sistema de expresión de CMD y un heterodímero covalente homogéneo para el caso de CBD h2B6-h3G8.

Se utilizó un ensayo ELISA de tipo sándwich para someter a prueba la unión de CBD h2B6-h3G8 para determinar la especificidad para cualquiera o ambas moléculas CD32B y/o CD16A (figura 5). CD32B sirvió como antígeno diana y se utilizó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ensayo ELISA reveló que el CBD h2B6-h3G8 heterodimérico tenía especificidad para ambos antígenos. Pruebas similares del CMD h3G8 (que no se unió a CD32B) no mostró señal.

El análisis de SPR indicó que el CMD h3G8 reconoció de manera inmunoespecífica sCD16 pero no sCD32B, que el CMD h2B6 reconoció de manera inmunoespecífica sCD32B pero no sCD16, y que el CBD h2B6-h3G8 reconoció de manera inmunoespecífica ambas moléculas sCD16 y sCD32B (figuras 6A-B). Ninguno de los diacuerpos sometidos a prueba se unió al receptor de control, sCD32A (figura 6C).

El análisis de SPR también se utilizó para estimar las constantes cinética y de equilibrio de los CMD y del CBD h2B6-h3G8 para sCD16 y/o sCD32B. Los resultados fueron comparados con las mismas constantes calculadas para un fragmento scFV de h3G8. Las figuras 7A-E muestran los resultados gráficos del análisis de SPR. Las velocidades de la cinética de asociación y disociación, así como la constante de equilibrio calculadas a partir de los resultados que se representan en la figura 7 se proporcionan en la Tabla 13.

TABLA 13. Constantes cinéticas y de equilibrio calculadas a partir de los datos BIAcore.

Receptor/analito	K asociación	K disociación	K equilibrio
diacuerpo sCD16 / h3G8	2.3 x10^5	0.004	18.0
CBD sCD16 / h2B6-h3G8	4.6 x 10^5	0.010	22.7
scFv sCD16 / h3G8	3.2 x 10^5	0.013	38.7
CBD sCD32B / h2B6-h3G8	3.6 x 10^5	0.005	15.0
diacuerpo sCD32B / h2B6	6.2 x 10^5	0.013	21.0

De acuerdo con los resultados de los análisis de ELISA, los estudios confirman que el heterodímero covalente h2B6-h3G8 conservó la especificidad para CD32B y CD16, y fue capaz de unirse a ambos antígenos al mismo tiempo. La molécula se representa esquemáticamente en la figura 8.

6.2 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc

En un esfuerzo por crear una molécula de tipo IgG, es decir, que comprende un dominio Fc, uno de los polipéptidos que contiene la molécula CBD heterodimérica presentada en el ejemplo 6.1 fue modificado para comprender además un dominio Fc (creando una cadena 'más pesada' y una 'más ligera', de modo análogo a una cadena pesada y ligera de un anticuerpo). La molécula biespecífica heterodimérica entonces contendría un dominio Fc que dimerizaría con una molécula homóloga, formando una molécula de tipo IgG tetramérica con tetravalencia (es decir, formada por dimerización a través de los dominios Fc de las moléculas biespecíficas heterodiméricas). Es interesante señalar que tales moléculas tetraméricas no se detectaron en los medios condicionados de los sistemas de expresión recombinante utilizando los ensayos funcionales, por ejemplo, analizando los medios condicionados para la unión inmunoespecífica a los antígenos diana. En cambio, solo una molécula dimérica que comprendía monómeros consistentes en el dominio VL, VH y Fc, se detectó en tales ensayos funcionales. Para someter a prueba que la estabilidad de la estructura tetramérica teórica era el problema, los polipéptidos que comprendían el dominio Fc fueron manipulados por ingeniería para comprender además una región bisagra, mientras que los polipéptidos que comprendían la cadena 'más ligera' fueron manipulados por ingeniería para comprender además los 6 aminoácidos C-terminales del dominio constante de cadena ligera kappa humana. Cuando tales cadenas 'más pesada' y 'más ligera' que se volvieron a manipular por ingeniería se coexpresaron en los sistemas de expresión recombinante, los ensayos funcionales detectaron moléculas de diacuerpo que eran capaces de unirse de manera inmunoespecífica alos antígenos diana y los anticuerpos anti-Fc.

Materiales y métodos

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de los constructos 1 y 2 que se presentan en el ejemplo 6.1. El constructo 5 (ID SEC NO: 14) y 6 (ID SEC NO: 15), fueron creados manipulando por ingeniería los constructos 1 y 2, respectivamente, para comprender además un dominio Fc. El constructo 7 (ID SEC NO: 16) fue creado manipulando por ingeniería el constructo 1 para comprender además la secuencia FNRGEC (ID SEC NO: 23) en su extremo C-terminal. El constructo 8 (ID SEC NO: 18) fue creado manipulando por ingeniería el constructo 2 para comprender además una región bisagra y un dominio Fc (que comprendía la mutación V215A). La representación esquemática de los constructos 5-8 se encuentra en la figura 9.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de la purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el ejemplo 6.1 Los plásmidos pMGX0669 y pMGX0667 sirvieron como moldes para las secuencias codificantes de los constructos 1 y 2, respectivamente. Las secuencias codificantes para el dominio Fc y/o el dominio bisagra de HuIgG fueron ID SEC NO: 5 o ID SEC NO: 1 e ID SEC NO: 5, respectivamente. Las secuencias codificantes de los ADN molde se amplificaron empleando cebadores directos e inversos para que los productos de PCR tuvieran secuencias solapantes, permitiendo a la PCR solapante generar las secuencias codificantes de los productos deseados.

La secuencia codificante del constructo 1 se amplificó a partir de pMGX0669 empleando cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 62, respectivamente. La secuencia codificante del constructo 2 se amplificó a partir de pMGX0667 empleando cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 63, respectivamente. El dominio bisagra-Fc de HuIgG se amplificó empleando los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 65 e ID SEC NO: 66, respectivamente. El constructo 7 (ID SEC NO: 16) se amplificó a partir de pMGX0669 empleando los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 67.

PCR solapante: Los productos iniciales de PCR fueron combinados como se describe más adelante, amplificados y purificados como se describe en el ejemplo 6.1.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo 5, ID SEC NO: 14 (mostrado esquemáticamente en la figura 9), se amplificó combinando los productos de PCR de las amplificaciones del constructo 1 y del dominio Fc de HuIgG, y los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 64, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo 6, ID SEC NO: 15 (mostrado esquemáticamente en la figura 9), se amplificó combinando los productos de PCR de las amplificaciones del constructo 2 y el Fc de HuIgG, y los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 66, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo 8, ID SEC NO: 18 (mostrado esquemáticamente en la figura 9), se amplificó combinando los productos de PCR de las amplificaciones del constructo 2 y el dominio bisagra-Fc de HuIgG, y los cebadores directo e inverso ID SEC NO: 55 e ID SEC NO: 66, respectivamente.

Los productos finales fueron clonados en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se describió anteriormente. El plásmido que codifica los constructos fue designado como se identifica en la Tabla 14:

TABLA 14. CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS

Constructo codificante	Designación de plásmido	Inserto
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	hu3G8VL-hu2B6VH- dominio bisagra hu-Fc (A215V)

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Se hicieron cuatro cotransfecciones diferentes en células HEK-293 utilizando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: pMGX0669 y pMGX0674, que codifican los constructos 1 y 6, respectivamente; pMGX0667 y pMGX0676, que codifican los constructos 2 y 5, respectivamente; y pMGX0677 y pMGX0678, que codifican los constructos 7 y 8, respectivamente.

La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura de tipo IgG, inmunoespecífico para FcγRIIB y FcγRIIIA. También se realizó una cotransfección adicional: pMGX0674 y pMGX0676, que codifican los constructos 6 y 5, respectivamente. Después de tres días en cultivo se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado fue cuantificada mediante análisis de ELISA anti-Fc de IgG utilizando el Fc purificado como patrón. Las concentraciones del producto en las muestras después se normalizaron basándose en la cuantificación, y las muestras normalizadas se utilizaron para los ensayos restantes.

ELISA: La unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio se sometió a ensayo mediante ELISA de tipo sándwich como se describió anteriormente. A menos que se indique de otro modo,, se utilizó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se utilizó CD16 conjugado con HRP como sonda.

Resultados

Se utilizó un ensayo ELISA para someter a prueba las muestras normalizadas de los sistemas de expresión recombinante que comprendían los constructos 1 y 6 (pMGX669-pMGX674), los constructos 2 y 5 (pMGX667-pNGX676) y los constructos 5 y 6 (pMGX674-pMGX676) para la expresión de moléculas de diacuerpo con capacidad para la unión simultánea a CD32B y CD16A (figura 10). Los datos del ensayo ELISA indicaron que la cotransfección con los constructos 1 y 6 y la cotransfección con los constructos 2 y 5 no pudieron producir un producto que pudiera unirse a cualquiera o ambos antígenos (figura 10, □ y ▲, respectivamente). No obstante, la cotransfección de los constructos 5 y 6 dio origen a la secreción de un producto con capacidad de unión a ambos antígenos CD32B y CD16. El último producto fue un dímero de los constructos 5 y 6, que contenía un sitio de unión para cada antígeno con una estructura como se representa esquemáticamente en la figura 11.

Con el fin de impulsar la formación de una estructura heterodimérica de tipo IgG, la secuencia codificante para seis aminoácidos adicionales se anexó al extremo C-terminal del constructo 1, generando el constructo 7 (ID SEC NO: 16 y mostrado esquemáticamente en la figura 9). Los seis aminoácidos adicionales, FNRGEC (ID SEC NO: 23), fueron derivados del extremo C-terminal de cadena ligera kappa e interactúan normalmente con el dominio bisagra superior de cadena pesada en una molécula de IgG. Un dominio bisagra fue luego manipulado por ingenieria para dar el constructo 6, generando el constructo 8 (ID SEC NO: 18 y figura 9). El constructo 8 además comprendía una mutación de aminoácido en la región bisagra superior, A215V. Los plásmidos de expresión que codifican el constructo 7 y el constructo 8, pMGX677 y pMGX678, respectivamente, fueron luego cotransfectados en células HEK-293 y expresados como se describe.

Las moléculas de diacuerpo producidas a partir del sistema de expresión recombinante que comprendía los constructos 7 y 8 (pMGX0677 + pMGX0678), fueron comparadas en un ensayo ELISA para la unión a CD32B y

CD16A a las moléculas de diacuerpo producidas a partir de los sistemas de expresión que comprendían los constructos 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674), los constructos 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678), y los constructos 6 y 7 (pMGX677 + pMGX674) (figura 12).

Como en lo anterior, la molécula producida por el sistema de expresión que comprendía los constructos 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674) demostró incapacidad para unirse a CD32A y CD16A (figura 10 y figura 12). Por el contrario, el producto de la coexpresión de los constructos 7 y 6 (pMGX0677 + pMGX0674) o de la coexpresión de los constructos 7 y 8 (pMGX0677-pMGX0678) pudieron unirse a CD32B y CD16 (figura 12). Se debe señalar que el constructo 7 es análogo al constructo 1, con la excepción de que el constructo 7 contiene la secuencia C-terminal FNRGEC (SEC ID NO: 23); y que el constructo 8 es análogo al constructo 6, salvo que el constructo 8 comprende un dominio bisagra y la mutación A215V. Los datos indican que la adición de los 6 aminoácidos adicionales a partir del extremo C-terminal de cadena ligera C-kappa (FNRGEC; ID SEC NO: 23) a la cadena 'más ligera' no portadora de Fc ayudó a estabilizar la formación de las moléculas de diacuerpo de tipo IgG tetraméricas, independientemente de si la cadena más pesada correspondiente comprendía un dominio bisagra (es decir, pMGX0677 + pMGX0674 y pMGX0677-pMGX0678, figura 12). La adición del dominio bisagra al polipéptido 'más pesado' portador de Fc, sin la adición de la secuencia C-terminal FNRGEC (ID SEC NO: 23) a la cadena 'más ligera' correspondiente, aparentemente fue incapaz de efectuar una estabilización similar (es decir, ausencia de unión por el producto de la cotransfección de los constructos 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678)). La estructura de la molécula de diacuerpo tetramérica se representa esquemáticamente en la figura 13.

6.3 EFECTO DEL ORDEN DE LOS DOMINIOS Y ENLACES DISULFURO ADICIONALES EN LA FORMACIÓN DE LA MOLÉCULA DE DIACUERPO DE TIPO IgG TETRAMÉRICA

El efecto de la estabilización adicional entre las cadenas polipeptídicas 'más ligera' y 'más pesada' de la molécula de diacuerpo de tipo IgG tetramérica se investigó mediante la sustitución de los residuos seleccionados en las cadenas polipeptídicas por cisteínas. Los residuos de cisteína adicionales permiten enlaces disulfuro adicionales entre las cadenas 'más pesada' y 'más ligera'. Además, se investigó el orden de los dominios sobre la actividad de unión moviendo el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc desde el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica al N-terminal. Aunque la actividad de unión de la molécula que comprendía los enlaces disulfuro adicionales no se alteró respecto a las moléculas de diacuerpo antes construidas con tales enlaces, la transferencia del dominio Fc o bisagra-Fc al extremo N-terminal de la cadena polipeptídica 'más pesada' que comprendía el diacuerpo mejoró sorprendentemente la afinidad de unión y/o la avidez de la molécula biespecífica para uno o ambos de sus antígenos diana.

Materiales y métodos

Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de los constructos 5, 6 y 8 presentados en el ejemplo 6.2. El constructo 9 (ID SEC NO: 19) y el constructo 10 (ID SEC NO: 20) (ambos mostrados esquemáticamente en la figura 13) fueron análogos a los constructos 8 y 6, con la excepción de que el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc, respectivamente, se desplazó del extremo C-terminal del polipéptido al N-terminal. Además, todos los dominios Fc utilizados fueron dominios Fc de IgG1 de tipo natural. El constructo 11, ID SEC NO: 21, (mostrado esquemáticamente en la figura 14) fue análogo al constructo 2 del ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal fue diseñado para comprender además la secuencia FNRGEC (ID SEC NO: 23). El constructo 12, ID SEC NO: 22 (mostrado esquemáticamente en la figura 14) fue análogo al constructo 5 del ejemplo 6.2, salvo que el dominio Fc comprendía además una región bisagra. Asimismo, en los constructos 11 y 12, el dominio VL de 2B6 y el dominio VH de 2B6 comprendía una sola modificación de aminoácido (G105C y G44C, respectivamente) de modo que una glicina de cada dominio fue sustituida por cisteína.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de la purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el ejemplo 6.1 y 6.2

PCR solapante: Los productos finales fueron construidos, amplificados y purificados empleando los métodos que se describen en el ejemplo 6.1 y el ejemplo 6.2.

Los productos finales fueron clonados en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se describió anteriormente. Los plásmidos codificantes de los constructos fueron designados como se identifica en la Tabla 15:

TABLA 15. CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS

Constructo codificante	Designación de plásmido	Inserto
9	pMGX0719	Dominio bisagra/Fc hu-hu-3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	Fc hu-hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-dominio bisagra/Fc hu
12	pMGX0717	hu3G8VL-hu2B6VH (G/C)-FNREG

Expresión de polipéptido/diacuerpo: Se realizaron tres cotransfecciones diferentes en células HEK-293 utilizando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: pMGX0669 y pMGX0719, que codifican los constructos 1 y 9, respectivamente; pMGX0669 y pMGX0718, que codifican los constructos 1 y 10, respectivamente; y pMGX0617 y pMGX0717, que codifican los constructos 11 y 12, respectivamente. La cotransfección de estos plásmidos fue diseñada para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura de tipo IgG, inmunoespecífico para FcγRIIB y FcγRIIIA. Tras tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado fue cuantificada por ELISA anti-Fc de IgG utilizando el Fc purificado como patrón. Las concentraciones del producto en las muestras fueron luego normalizadas basándose en la cuantificación y las muestras normalizadas fueron utilizadas en los ensayos restantes.

ELISA: La unión de las moléculas de diacuerpo secretadas al medio se sometió a ensayo mediante ELISA de tipo sándwich como se describió anteriormente. A menos que se indique, se utilizó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se utilizó CD16 conjugado a HRP como sonda.

Análisis de inmunotranferencia de tipo Western: Aproximadamente 15 ml de medio condicionado proveniente de las tres cotransfecciones antes descritas fueron analizados por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Un gel fue teñido con Simply Blue Safestain (Invitrogen) y un gel idéntico fue transferido a membranas de PVDF (Invitrogen) empleando métodos de transferencia convencionales. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% en PBS 1X. Luego se incubó la membrana en 10 ml de los fragmentos H+L de anticuerpo de cabra anti-IgG1 humana, conjugados con HRP, diluidos 1:8.000 en leche desnatada en polvo al 2% en PBS 1X/Tween 20 al 0,1% a temperatura ambiente durante 1 h con agitación suave. Después de un lavado con PBS 1X/Tween 20 al 0,3%, 2X 5 min cada uno, luego 20 min a temperatura ambiente, la membrana se desarrolló con el sistema de detección de Western blotting ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La película se desarrolló en un procesador de rayos X.

Resultados

Los medios condicionados de los sistemas de expresión recombinante que comprendían los constructos 1 y 9; los constructos 1 y 10; y los constructos 11 y 12 se analizaron mediante SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) y análisis de Western-blot (utilizando un anticuerpo anti-IgG como sonda). El análisis de inmunotranferencia de tipo Western reveló que el producto de los sistemas que comprendían los constructos 11 y 12 o que comprendían los constructos 9 y 1 formaron principalmente una sola especie de molécula de aproximadamente 150 kDa (figura 14, carriles 3 y 2, respectivamente). Ambos productos tienen enlaces disulfuro internos manipulados por ingeniería entre las cadenas 'más ligera' y 'más pesada' que comprendían el diacuerpo. Por el contrario, la molécula sin enlaces disulfuro internos manipulados por ingeniería entre las cadenas 'más ligera' y 'más pesada' formadas por los constructos 10 y 11, formaron al menos dos especies moleculares de pesos moleculares aproximados de 75 ~100 kDa (figura 14, carril 1).

A pesar de los resultados del análisis de inmunotranferencia de tipo Western, se encontró que cada uno de los tres productos era capaz de unirse a CD32A y CD16 (figura 15). Sorprendentemente, respecto al producto que comprendía el dominio bisagra-Fc C-terminal (formado por los constructos 11 y 12), el producto de ambos sistemas en donde el dominio Fc (o el Fc-bisagra) estaba en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica que comprendía Fc (es decir, la cadena 'más pesada') (constructos 9+1 y constructos 10+1) demostró afinidad y/o avidez potenciada para uno o ambos de sus péptidos diana (es decir, CD32B y/o CD16).

6.4 EFECTO DEL SITIO DE ESCISIÓN INTERNO/EXTERNO SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNA Y LA EXPRESIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO COVALENTE; DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO QUE COMPRENDE PARTES DE LA CADENA LAMBDA Y EL DOMINIO BISAGRA DE IgG HUMANA

Como se describe en el presente documento, las cadenas polipeptídicas individuales del diacuerpo o la molécula de diacuerpo de la invención pueden expresarse como una sola molécula precursora de poliproteína. La capacidad de los sistemas recombinantes descritos en los ejemplos 6.1-6.3 para procesar apropiadamente y expresar un CBD funcional a partir de tal precursor de poliproteína se sometió a prueba manipulando por ingeniería un ácido nucleico para codificar las cadenas polipeptídicas primera y segunda de un CBD separadas por un sitio de escisión interno, en particular, un sitio de escisión de furina. El CBD funcional fue aislado a partir del sistema recombinante que comprendía la molécula precursora de poliproteína.

Como se analiza en el ejemplo 6.3, la adición de los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (ID SEC NO: 23), se encontró que estabiliza la formación del diacuerpo, tal vez mediante las interacciones entre cadenas potenciadas entre los dominios que comprendían ID SEC NO: 23 y aquellos dominios que comprendían un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. El efecto estabilizador de esta interacción de tipo cadena lambda/Fc se sometió a prueba en CBD en donde ninguna cadena polipeptídica comprendía un dominio Fc. Una cadena polipeptídica del diacuerpo fue manipulada por ingenieria para contener la ID SEC NO: 23 en su extremo C-terminal; la cadena polipeptídica asociada fue manipulada por ingenieria para comprender la secuencia de aminoácidos VEPKSC (ID SEC NO: 77), que fue derivada del dominio bisagra de una IgG. La comparación de este

CBD con el compuesto por los constructos 1 y 2 (del ejemplo 6.1) reveló que el CBD que comprendía los dominios derivados del dominio bisagra y la cadena lambda mostraron afinidad ligeramente mayor para uno o ambos de sus epítopos diana.

Materiales y métodos

Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas: Precursor de poliproteína: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir 2 moléculas precursoras de poliproteína, ambas representadas esquemáticamente en la figura 17. El constructo 13 (ID SEC NO: 95) compuesto por el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica el constructo 13 se proporciona en la ID SEC NO: 96. El constructo 14 (ID SEC NO: 97) (figura 17), compuesto por el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, un sitio FMD (proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa), el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica el constructo 14 se proporciona en la ID SEC NO: 98.

Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de los constructos 1 y 2 presentados en el ejemplo 6.1. El constructo 15 (ID SEC NO: 99) (figura17) fue análogo al constructo 1 (ID SEC NO: 9), presentado en el ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal del contructo 15 comprendía la secuencia de aminoácidos FNRGEC (ID SEC NO: 23). La secuencia del ácido nucleico que codifica el constructo 15 se proporciona en la ID SEC NO: 100. El constructo 16 (ID SEC NO: 101) (figura 17) fue análogo al constructo 2, que se presenta en el ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal del constructo 16 comprendía la secuencia de aminoácidos VEPKSC (ID SEC NO: 77). La secuencia del ácido nucleico que codifica el constructo 16 se proporciona en ID SEC NO: 102.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos para la PCR y la purificación del producto de PCR fueron como se describe en los ejemplos 6.1 y 6.2

PCR solapante: Los productos finales fueron construidos, amplificados y purificados empleando los métodos que se describen en el ejemplo 6.1 y el ejemplo 6.2 con cebadores apropiados

Los productos finales fueron clonados en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se describió anteriormente. El plásmido que codifica los constructos fue diseñado como se identifica en la Tabla 16:

TABLA 16. CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS

Constructo codificante	Designación de plásmido	Inserto
13	pMGX0750	3G8VL-2.4G2VH-furina-2.4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6VL-Hu3G8VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3G8VL-Hu2B6VH-VEPKSC

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Una transfección y una cotransfección en células HEK-293 utilizando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1, se realizaron como sigue: pMGX0750 que codifica el constructo 13; y cotranfección: pMGX0752 y pMGX0753, que codifican los constructos 15 y 16, respectivamente. Después de tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado y el producto secretado se purificó por afinidad como se describe.

ELISA: La unión de las moléculas de diacuerpo secretadas al medio se sometió a ensayo mediante ELISA de tipo sándwich como se describió anteriormente. Se utilizó CD32B murino para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se utilizó CD16A conjugado con HRP como sonda para el producto de la cotransfección de los constructos 15 y 16. Se utilizó mCD32B como proteína diana y CD16A conjugado a biotina se utilizó como sonda para el sistema recombinante que comprendía el constructo 13.

Resultados

El medio condicionado de los sistemas de expresión recombinante que comprendían los constructos 13 fue analizado por ELISA de tipo sándwich. El ensayo ELISA sometió a prueba la unión del CBD para la especificidad a cualquiera o ambas de las moléculas mCD32B y/o CD16 (figura 18). La molécula CD32B sirvió como antígeno diana y se utilizó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ensayo ELISA reveló que el CBD h2.4G2-h3G8 heterodimérico producido a partir del precursor de poliproteína tenía especificidad para ambos antígenos.

Del mismo modo, el producto purificado generado por cotransfección de los vectores que codifican los constructos 15 y 16 se sometió a prueba en un ensayo ELISA y se comparó con el producto que comprendía los constructos 1 y 2 (ejemplo 6.1). La molécula CD32B sirvió como antígeno diana y CD16A se utilizó como sonda secundaria. Al igual que con el producto compuesto por los constructos 1 y 2, se encontró que el producto de los constructos 15 y 16 era

capaz de unirse simultáneamente a CD32B y CD16A. De hecho, el producto de los constructos 15 y 16 mostró afinidad ligeramente potenciada para uno o ambos antígenos diana, es decir, CD32B o CD16A. Esto tal vez se debe a la estabilidad y/o a la fidelidad aumentada (respecto a la interacción del dominio VH-VL de tipo natural) de la asociación intercatenaria producida por la interacción de la región de la cadena lambda, FNRGEC (ID SEC NO: 23) y la región bisagra VEPKSC (ID SEC NO: 77), que está ausente en el producto compuesto por los constructos 1 y 2.

6.5 USO DE REACTIVOS DE REDIRECCIONAMIENTO DE AFINIDAD DOBLE ("DART") PARA UNIR ENTRE SÍ MÚLTIPLES AFINIDADES

Un aspecto de la presente invención se refiere a reactivos de redireccionamiento de afinidad doble ("DART") novedosos, así como nuevas formas para unir entre sí múltiples afinidades. Las moléculas "DART" pueden ser monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas, etc., siendo capaces de este modo de unirse simultáneamente a uno, dos, tres o más epítopos diferentes (que pueden ser de antígenos iguales o diferentes). Las moléculas "DART" además pueden ser monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes. hexavalentes, etc., siendo capaces de este modo de unirse simultáneamente a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más moléculas. Como se muestra en la figura 35, estos dos atributos de los DART pueden combinarse, por ejemplo, para producir anticuerpos biespecíficos que sean tetravalentes, etcétera.

Un avance es el desarrollo de una molécula de DART que tiene afinidad para un receptor inmunitario prototipo, huCD32B, así como afinidad para un hapteno, fluoresceína. Este DART, denominado "2B6/4420", sirve como adaptador universal, capaz de coligar huCD32B con moléculas que interaccionan con las parejas de unión conjugadas a fluoresceína. CD32B es un receptor de Fc que tiene la capacidad para extinguir señales activadoras en virtud del agrupamiento con complejos inmunitarios de señalización de la activación. En su implementación inicial, esta tecnología permite realizar un examen rápido de diversas dianas biológicas para el agrupamiento con huCD32B sin la necesidad de generar nuevos constructos de DART. El DART 2B6/4420 puede mezclarse simplemente con un anticuerpo marcado con fluoresceína contra un receptor de superficie celular y con ello imitar la acción de un DART con afinidad para ese receptor (figura 20). Además, este reactivo permite la unión eficiente de reactivos de afinidad que no se expresen o produzcan fácilmente, permitiendo superar limitaciones técnicas. Los DART que contienen 2B6/4420 son evidentemente útiles como herramientas de investigación y también como candidatos clínicos. Los DART 2B6/4420 producidos a partir de células HEK293 pueden unirse al mismo tiempo a CD32B y fluoresceína en un ensayo ELISA. Además, puede inhibir la proliferación celular mediante el reclutamiento de CD32B al complejo BCR a través de la coligación con CD79. El brazo de 2B6 de la molécula de DART puede ser sustituirse por una secuencia de anticuerpo diferente o una secuencia de unión que tenga otra especificidad importante.

Materiales y métodos:

Constructos plasmídicos: La molécula 2B6/4420 se deriva de las secuencias del anticuerpo monoclonal AcM 2B6 humanizado (hu2B6, MGA321) y una versión quimérica Fv de ratón/Fc humano del AcM anti-fluoresceína, 4420. El DART completamente ensamblado consiste en dos polipéptidos, dando como resultado una unión covalente de las dos regiones Fv. El primer polipéptido consiste en una secuencia señal de secreción seguida por el VL de hu2B6 producido como una proteína de fusión con 4420VH separado por un ligador consisten en los residuos de aminoácidos GGGSGGGG. La secuencia FNRGEC, derivada del extremo C-terminal de cadena ligera kappa, se anexa al extremo C-terminal de este polipéptido. El otro polipéptido consiste en la secuencia señal-4420VL-GGGSGGGG-hu2B6VH, con la secuencia VEPKSC derivada del extremo C-terminal del fragmento Fd de IgG1 humana, anexado al extremo C-terminal. Las cisteínas en las dos cadenas forman un enlace disulfuro, que une de manera covalente los dos polipéptidos entre sí (figura 20). Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos descritos se amplificaron por PCR a partir de los plásmidos existentes, se combinaron por PCR solapante y se clonaron en pCIneo (Promega) entre los sitios Nhe I y EcoR I. Por último, se utilizó como control un DART con afinidad para huCD32B y huCD16 (2B6/3G8) que había sido anteriormente construido empleando métodos similares a los antes descritos.

Anticuerpos: Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD79b humano, CB3.1 y CB3.2 (hibridomas) fueron obtenidos del Dr. Cooper MD, Universidad de Alabama en Birmingham, Birmingham AL. Se marcaron CB3.1 y CB3.2 con isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford IL). El fragmento F(ab')2 de una IgG anti-ratón producido en cabra (GAM), específico del fragmento Fc se obtuvo de Jackson Laboratories (West Grove, PA). El AcM de ratón anti-huCD32B, 3H7, se produjo y purificado de manera interna. El anticuerpo anti-2B6Fv producido en cabra se produjo inmunizando cabras con el anticuerpo completo hu2B6 y se purificó por afinidad contra la región Fv de hu2B6. Los anticuerpos HuIgG, FITC-huIgG y anti-IgG de ratón conjugado a HRP se obtuvieron de Jackson Immunoresearch. El anticuerpo anti-cabra conjugado con HRP se obtuvo de Southern Biotech.

Expresión de DART: Los plásmidos que codifican cada cadena fueron cotransfectados en células 293H (Invitrogen) utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína secretada se recogió 3-4 veces en intervalos de tres días y se purificó por cromatografía de líquidos contra una forma soluble inmovilizada de CD32B.

ELISA: Los DART 2B6/4420 o 2B6/3G8 fueron capturados en placas MaxiSorp (Nalge Nunc) recubiertas con proteína S marcada con FITC (Novagen), IgG humana o FITC-huIgG. La detección procedió uniendo el ectodominio de CD32B soluble, seguido por 3H7 (un anticuerpo monoclonal de ratón específico para CD32B), y por último anticuerpo anti-ratón-HRP. De manera alternativa, se realizó la detección uniendo un antisuero purificado por afinidad de un anticuerpo policlonal anti-Fv 2B6 producido en cabra, seguido por anticuerpo anti-cabra-HRP. Se detectó la actividad de HRP utilizando un sustrato TMB colorimétrico (BioFXy) y se leyó en un lector de placas para ELISA VersaMax.

Purificación y ensayo de proliferación de células B: Se separaron células mononucleares de sangre periférica mediante un método de gradiente Ficoll/Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech. RU) utilizando sangre de donantes sanos. Se aislaron los linfocitos B utilizando el kit Dynal B Cell Negative Isolation (Dynal Biotechnology Inc., NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de células B aisladas ($CD20^+$) fue mayor del 90% como se estimó mediante análisis de FACS. Para el ensayo de proliferación, las células B purificadas fueron sembradas en medio RPMI 1640 completo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano a una densidad celular de 1×10^5 células por pocillo en un volumen final de 200 µl y se incubaron durante 48 horas en presencia y ausencia de anticuerpos y diacuerpos a 37ºC en el 5% de CO_2. Luego se añadió 1 µCi/pocillo de [^{3}H]timidina (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se continuó la incubación durante otras 16-18 h antes de realizar la recogid. La incorporación de [^{3}H]timidina se midió por cuenta de centello líquido

Resultados

Con el fin de demostrar que el DART 2B6/4420 era activo y específico se realizaron dos experimentos ELISA. Primero, el 2B6/4420 o 2B6/3G8 (como control negativo) se unio a una proteína conjugada con fluoresceína (proteína S) que había sido recubierta en placas para ELISA. Después, el brazo de 2B6 de DART fue acoplado por CD32B soluble. La unión se detectó mediante otro anticuerpo CD32B con un epítopo que no se solapa con el de 2B6, seguido por un anticuerpo secundario conjugado a HRP. Aunque el DART 2B6/4420 es capaz de unirse simultáneamente a fluoresceína y CD32B, el DART 2B6/3G8 no tiene tal capacidad (figura 21, panel A). Cuando los DART se capturan en placas recubiertas con CD32B soluble y se detecta la unión mediante un anticuerpo específico para Fv hu2B6, ambos DART muestran buena unión. Para demostrar que el DART 2B6/4420 fue capaz de unir la fluoresceína conjugada a IgG humana (dado que este es el contexto de la implementación inicial de este reactivo), el anticuerpo HuIgG, no marcado o marcado con fluoresceína, se unió a placas para ELISA y se usó para capturar el DART 2B6/4420. De nuevo, se utilizó el DART 2B6/3G8 como control negativo. Se detectó la unión utilizando un anticuerpo específico para Fv Hu2B6. El DART 2B6/4420 se une claramente a FITC-HuIgG, pero no se une a HuIgG no marcado, demostrando que este DART es capaz de unir fluoresceína conjugada a un anticuerpo y que no hay unión significativa al anticuerpo solo. Como se esperaba, no se detectó ninguna unión por el DART 2B6/3G8 en ninguno de estos contextos.

Se realizaron experimentos para demostrar que el DART 2B6/4420 era capaz de funcionar como reactivo de doble afinidad que podría tener un efecto sobre la señalización en el contexto de un ensayo basado en células. Se ha demostrado que la coagregación de CD32B con BCR inhibe la activación de células B. Se exploró la capacidad de DART 2B6/4420 para coacoplarse con CD32B estando el BCR recubierto con anticuerpos αCD79b marcados con fluoresceína y para activar la inhibición de la proliferación celular. Se realizó una selección negativa de células B de sangre humana y se activaron a través del tratamiento empleando concentraciones crecientes de anticuerpo de ratón anti-CD79b humano marcado con FITC, los clones CB3.1 y CB3.2, y mediante la adición de un fragmento F(ab')2 de un GAM específico para Fc como reactivo secundario con el fin de reticular el BCR, junto con una concentración fija (5 µg/ml) de DART 2B6/4420 o una cantidad equivalente del DART 2B6/3G8, de este modo se utilizó como control una molécula que no selecciona como diana la fluoresceína. La proliferación celular, medida como incorporación de [^{3}H]-timidina, aumentó con concentraciones crecientes del activador del anticuerpo monoclonal anti-CD79b-FITC en ausencia de los DART o en presencia del DART 2B6/3G8 de control. La presencia del DART 2B6/4420 dio origen a una disminución evidente en la proliferación de células B en todas las concentraciones del anticuerpo monoclonal anti-CD79b humano-FITC (figura 22, paneles A y B y figura 23, panel A).

No se observó inhibición de la proliferación cuando las células B recubiertas con CB3.2 no marcado y activadas empleando las mismas condiciones experimentales fueron tratadas con el DART 2B6/4420 demostrando su especificidad para su diana (figura 23, panel B). Estos datos demuestran que el DART 2B6/4420 puede formar reticulación con CD32B y el BCR y suministrar una señal inhibitoria con capacidad para bloquear la activación de células inducida por el receptor del antígeno.

6.6 DART INMUNOTERAPÉUTICO CONTRA TUMORES MALIGNOS DE CÉLULAS B QUE EXPRESAN CD32B

En la actualidad, los tumores malignos de células B se tratan empleando el anticuerpo anti-CD20 Rituxan®. Algunos tumores malignos de células B, no obstante, no expresan CD20 o se vuelven resistentes a Rituxan. Los DART de la presente invención proporcionan una inmunoterapia alternativa capaz de superar los problemas asociados con el uso del anticuerpo anti-CD20 Rituxan®.

La molécula MGD261 es una molécula de redireccionamiento de afinidad doble (DART) que se une a hCD32B (a través del anticuerpo h2B6) y hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

La eficacia (depleción de células B) y seguridad de MGD261 se sometió a prueba en ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD16A+, ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD32B+ y ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+. En este experimento con dosis repetidas, los ratones recibieron 6 inyecciones IV (dos veces a la semana durante 3 semanas). La depleción de células B fue monitorizada por FACS. Se monitorizó la seguridad mediante observación al lado de la jaula.

Los datos indican que la molécula MGD261 es capaz de producir depleción de células B en ratones doblemente transgénicos sin inducir algún efecto secundario significativo.

Datos: a ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD16A+, ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD32B+ y ratones C57B1/6 mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ de la colonia reproductora MacroGenics se les inyectó por vía intravenosa en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió la sangre en los días -19 (antes de la extracción de sangre), 4, 11, 18, 25 y 32 para realizar el análisis de FACS. La salud y actividad de los animales fue registrada tres veces a la semana.

Diseño:

Grupo	Animales		Artículo a ensayar	Dosis (mg/kg)
	#	Ratones		
A	4	mCD32-/- hCD16A+	hE16	10
B	5	mCD32-/- hCD16A+	MGD261	10
C	3	mCD32-/- hCD32B+	hE16	10
D	3	mCD32-/- hCD32B+	MGD261	10
E	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	hE16	10
F	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	10
G	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	3
H	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	1
I	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	0.3

Método para el análisis de FACS: Las muestras de sangre completa se recogieron 18 días antes de la administración de h2B6-h3G8 y 4, 11, 18, 25 y 32 días después del tratamiento. Las muestras de sangre fueron analizadas para determinar el efecto de la molécula h2B6-h3G8 sobre el recuento de células B mediante un ensayo basado en FACS. Se utilizó un protocolo sin lavado para el recuento de células B, células T y PMN utilizando perlas FlowCount, obtenidas de Beckman Coulter. El panel de anticuerpos que se utilizó para el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para células T, CD19-APC para células B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

Los ratones tratados con hE16 o MGD261 (con cualquier concentración) no mostraron algún signo de incomodidad en ningún momento durante el experimento.

Se observó depleción de células B en los ratones doblemente transgénicos hCD16A y hCD32B. El diacuerpo h2B6-3G8 se acopla a las células efectoras que expresan hCD16A y a las células B que expresan hCD32B; los acoplamientos fueron necesarios para la aniquilación de células B. La depleción de células B no se observó en ratones unitransgénicos (figura 24). No hubo cambios importantes en las células T y el nivel de PMN durante el estudio.

Como otra demostración de la inmunoterapia alternativa de la presente invención, se construyó un sustituto de MGD261, denominado “2.4G2-3G8 DB”. La molécula 2.4G2-3G8 DB es una molécula de redireccionamiento de doble afinidad (DART) que se une a mCD32B (a través del anticuerpo 2.4G2) y a hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

La eficacia (depleción de células B) y seguridad del diacuerpo 2.4G2-3G8 se sometió a prueba en ratones C57B1/6 mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+. En este experimento con dosis repetidas, los ratones recibieron 9 inyecciones IP (intraperitoneal) (tres veces a la semana durante 3 semanas). Se monitorizó la depleción de células B mediante análisis de FACS. La seguridad fue monitorizada por observación en el lado de la jaula.

Los datos indican que el diacuerpo DB 2.4G2-3G8 es capaz de producir la depleción de células B en ratones transgénicos hCD16 sin inducir ningún efecto secundario significativo.

Datos: A ratones C57B1/6 mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+ de la colonia reproductora MacroGenics se les inyectó por vía IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 la molécula de diacuerpo 2.4G2-3G8 (7 µg/ratón), o PBS. Se recogió sangre en los días -10 (antes de la extracción de sangre), 4, 11 y 18 para el análisis de FACS. La salud y actividad de los animales fue registrada tres veces a la semana.

Grupo	# de animales	Dosis µg/ms	Artículo a ensayar	Vía	Puntos temporales de la recolección de sangre
A	2 mCD16-/-	-	PBS	IP	Dias -10, 4, 11, 18
B	2 mCD16-/- 16A+ B6	-	PBS	IP	Dias -10, 4, 11, 18
C	2 mCD16-/- 16B+	-	PBS	IP	Dias -10, 4, 11, 18
D	2 mCD16-/- 16A+ 16B+	-	PBS	IP	Dias -10, 4, 11, 18
E	6 mCD16-/-	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Dias -10, 4, 11, 18
F	6 mCD16-/- 16A+ B6	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Dias -10, 4, 11, 18
G	6 mCD16-/- 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Dias -10, 4, 11, 18
H	6 mCD16-/- 16A+ 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Dias -10, 4, 11, 18

Método para al análisis de FACS: Las muestras de sangre completa se recogieron 10 días antes de la administración de la molécula 2.4G2-3G8 y 4, 11 y 18 días después de iniciar el tratamiento. Las muestras de sangre fueron analizadas para determinar el efecto del diacuerpo 2.4G2-3G8 sobre el recuento de células B utilizando un análisis a base de FACS. Se utilizó un protocolo sin lavado para el recuento de células B, células T y PMN utilizando tubos TruCOUNT, obtenidos de BD Immunocytometry System. El panel de anticuerpos utilizado en el ensayo fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para células T, CD19-APC para células B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

Los ratones tratados con hE16 o el diacuerpo 2.4G2-3G8 no mostraron algún signo de incomodidad en ningún momento durante el experimento.

Se observó depleción de células B en los ratones mCD16-1-hCD16A+ o mCD16-1-hCD16A+ hCD16B+ pero no en ratones mCD16-/-. Estos datos indican que las células efectoras que portan hCD16A fueron necesarias para la aniquilación de células B (figura 25). No hubo cambios importantes en el nivel de células T y PMN durante el estudio.

Modelo intravenoso (IV): Se sometió a prueba la actividad antitumoral de la molécula MGD261 empleando un modelo intravenoso (IV) de la línea celular tumoral humana Raji. La línea celular Raji es una línea celular de linfoma de Burkitt humano que expresa hCD32B. Cuando se inyectan por vía intravenosa en ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-, las células tumorales se localizan en la columna vertebral y da como resultado parálisis de las patas traseras.

Los datos indican que MGD261 es capaz de bloquear el crecimiento de células tumorales Raji *in vivo* en ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-. Los datos indican que MGD261 puede utilizarse en el tratamiento de tumores malignos de células B que expresen CD32B en humanos.

Datos: A ratones C57B1/6 mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- de doce-veinte semanas de la colonia reproductora MacroGenics se les inyectó por vía IV en el día 0 $5x10^6$ células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también fueron tratados por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2,5 µg de MGD261 o con PBS (control negativo). Luego se observó a los ratones a diario y se documentó el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que presentaron parálisis de las patas traseras fueron sacrificados.

Resultados: Los ratones tratados con PBS murieron entre el día 25 y el día 50. Los ratones tratados con MGD261 sobrevivieron al menos hasta el día 90 (figura 26). El aumento de la supervivencia tiene significación estadística. Una comparación de las curvas de supervivencia utilizando la prueba de rangos logarítmicos dio una χ^2 de 96,46 (grados de libertad (df) 9; valor P < 0,0001).

6.7 EXPRESIÓN DE DART EN PROCARIOTAS

Se realizaron experimentos para demostrar la capacidad para producir DART en huéspedes no mamíferos. Por consiguiente, *Escherichia coli* fue transformada con un plásmido que expresa DART, y se monitorizó la expresión de DART.

Materiales y métodos:

Construcción del plásmido: 3G8 es un anticuerpo monoclonal humanizado contra HuCD16. El DART descrito en este caso consiste en dos cadenas unidas de manera covalente, cada una de las que tiene un dominio VL seguido por un espaciador, luego un VH seguido por un residuo de Cys en un buen contexto para formar un enlace disulfuro con la cadena contraria. La secuencia de DART que codifica 3G8VL-GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly (ID SEC NO: 10)-3G8VH-LeuGlyGlyCys se amplificó por PCR a partir de un constructo de expresión eucariota existente y se digirió con las enzimas Nco I y EcoR I. El vector diana fue pET25b (+) (Novagen), que contiene una secuencia líder *pelB* para la secreción en *E. coli*. Antes de la inserción de las secuencias DART 3G8/3G8, el vector fue modificado como sigue: primero, el promotor de T7 fue sustituido por el promotor lac de menor actividad con el fin de favorecer la expresión soluble, aunque de menor nivel, de las proteínas bajo su control. Además, se introdujeron dos mutaciones puntuales para eliminar dos codones Met internos presentes al principio del sitio de clonación múltiple (MCS) para favorecer el inicio en el Met presente al principio de la secuencia líder *pelB*. La molécula de DART que se produce con este constructo consiste en dos brazos de región V que tienen la misma especificidad, a saber HuCD16.

Expresión: Células BL21DE3 (Novagen) fueron transformadas con el plásmido pET25b(+) T7-lac+ 3G8/3G8 y una colonia resistente a ampicilina se utilizó para sembrar el caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó 0,5 unidades de DO600, se añadió 0,5 mM de IPTG para inducir la expresión. Se hizo crecer el cultivo a 30ºC durante 2 horas y se recogió el medio libre de células.

Purificación: El DART 3G8/3G8 se purificó en un proceso de dos etapas utilizando cromatografía de afinidad y de exclusión molecular. El DART fue capturado a partir del medio condicionado utilizando cromatografía de afinidad. Específicamente, CD16A se acopló a Sepharose 4B (GE Healthcare) activado con CNBr. La resina Sepharose-CD16A se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de cargarla. Tras terminar la carga, se lavó la resina con tampón de equilibrado antes de realizar la elución de DART unido con glicina 50 mM pH 3,0: El DART eluido fue inmediatamente neutralizado con Tris/HCl 1 M pH 8,0 y se concentró utilizando un concentrador de tipo centrífuga (Vivaspin 20, 10k MWCO PES, VivaScience Inc.). El DART concentrado además se purificó por cromatografía de exclusión molecular empleando una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS.

Resultados

1,7 litros del medio condicionado con el cultivo de *E. coli* fueron procesados a través de la columna Sepharose-CD16A. El rendimiento de DART fue de 0,12 mg. El análisis de DART purificado por SDS-PAGE y SEC demostró comparabilidad con el DART de control expresado en células de mamífero (CHO) (figura 27).

Ensayo de unión ELISA para el DART h3G8-h3G8 expresado en E. coli: La expresión de DART h3G8-h3G8 en *E. coli* se midió utilizando un ensayo ELISA. 50 µl/pocillo de una disolución 2 µg/ml del anticuerpo específico de Fv anti-h3G8, 2C11, fueron recubiertos en una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón carbonato a 4ºC durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1%) y luego se bloqueó con BSA al 0,5% en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir el DART a ensayar. Durante el bloqueo el DART h3G8-h3G8, el h2B6-h3G8 y el DART h2B6-h2B6 (control negativo) expresado en *E. coli* fueron diluidos en 1 µg/ml y 0,3 µg/ml en PBST/BSA. 50 µl/pocillo de los DART diluidos fueron añadidos a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavado con PBS-T tres veces, se añadió a la placa 50 µl/pocillo de una disolución 0,1 µg/ml de la proteína de fusión sCD16-Fc biotinilada. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se utilizaron 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) para la detección y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló empleando 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, se detuvo la reacción con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1%. La DO450 nm fue leída empleando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura empleando el software GraphPadPrism 3.03 (figura 28).

6.8 MUERTE DE CÉLULAS B HUMANAS INDUCIDA POR DART

Células PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas fueron incubadas durante la noche con: CD16-CD32B-hu3G8-hu2b6 (antes descrito); el anticuerpo 2B6 quimérico aglicosilado ch2B6-aglyc (descrito en la solicitud de patente estadounidense en tramitación junto con la presente con n.º de serie 11/108.135, publicada como documento US2005/0260213, incorporada en el presente documento como referencia) y CD16-CD79. Las secuencias de ADN y de proteína codificada de CD16-CD79 son las siguientes:

H3G8VL-CB3.IVH

Secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 226):

```
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga        50
gagggccacc atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg       100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc       150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct ggggtcccag acaggtttag       200
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc agcctgcagg       250
ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac       300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg       350
cggaggccag gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg       400
gggcttcagt gaagctgtcc tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc       450
tactggatga actgggtgaa gcagaggcct ggacaaggcc ttgaatggat       500
tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat caaatgttca       550
aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg       600
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag       650
agctatgggc tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg       700
agcccaaatc ttgt                                              714
```

Secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 227):

```
DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL        50
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY       100
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLQQPGAEL VRPGASVKLS CKASGYTFTS       150
YWMNWVKQRP GQGLEWIGMV DPSDSETHYN QMFKDKATLT VDKSSSTAYM       200
QLSSLTSEDS AVYYCARAMG YWGQGTSVTV SSVEPKSC                    238
```

CB3.1VL-h3G8VH

Secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 228):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca        50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg       100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac       150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt       200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg       250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg       300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg       350
aggcggaggc caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc       400
ccacacagac cctcacactg acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc       450
acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt cagcctcccg ggaaggctct       500
agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc tataatccag       550
ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta       600
gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg       650
tgctcaaata aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg       700
tcactgtgag ctcattcaac aggggagagt gt                          732
```

Secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 229):

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN        50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP       100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS       150
TSGMGVGWIR QPPGKALEWL AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV       200
VLTMTNMDPV DTATYYCAQI NPAWFAYWGQ GTLVTVSSFN RGEC             244
```

Se sometió a ensayo la apoptosis mediante el análisis de FACS como el porcentaje de población de células B PI+anexina-V+ (células CD20+) en la población total FSC/SSC no regulada (figura 29).

6.9 DART 8B5-CB3.1

8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

La molécula 8B5VL se amplificó utilizando H9 y Igh630R como cebadores, como molde se utilizó ch8B5Lc. CB3.1VH se amplificó utilizando como cebadores Igh628F e Igh629R, se utilizó ch8B5Hc como molde. Se incorporó la secuencia ligadora en los cebadores Igh630R e Igh628F. El ligador C-terminal y el codón de terminación fueron incorporados en el cebador Igh629R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una razón equimolar, luego se amplificaron utilizando H9 e Igh629R como cebadores. El producto de PCR solapado se digirió luego con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC

CB3.1 VL se amplificó utilizando H9 e Igh630R, que compartía la misma secuencia que 8B5VL en FR4, como cebadores, y como molde chCB3.1 Lc. 8B5VH se amplificó utilizando como cebadores Igh631F e Igh640R, y como molde ch8B5Hc. La secuencia ligadora fue incorporada en los cebadores Igh630R e Igh631F. El ligador C-terminal y el codón de terminación fueron incorporados en el cebador Igh640R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una razón equimolar, luego se amplificaron utilizando como cebadores H9 e Igh640R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

Etiqueta anti-flag -8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

Una etiqueta anti-flag fue insertada entre la secuencia señal y 8B5VL por PCR solapante. La secuencia señal y la etiqueta Flag se amplificaron utilizando como cebadores H9 e Igh647R y como molde ch8B5Lc. La molécula 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC se amplificó de nuevo utilizando como cebadores Igh647F e Igh629R y como molde 8B5 VL-CB3.1 VH-VEP SC. Los productos de PCR se purificaron en gel y mezclados entre sí en proparte equimolar, luego se amplificaron empleando como cebadores H9 e Igh629R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

8B5VL-CB3.1 VH-LGGC

Para generar un ligador C-terminal diferente en el constructo 8B5VL-CB3.1 VH-VEPKSC, el constructo se amplificó de nuevo empleando como cebadores H9 e Igh646R. El ligador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh646R. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-LGGC

Se utilizó la misma estrategia para crear CB3.1 VL-8B5 VH-LGGC. El ligador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh648R y se utilizó como molde CB3.1 VL-8B5 VH-FNRGEC. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

Etiqueta anti-flag -8B5VL-CB3.1 VH-LGGC

También se utilizó la misma estrategia para crear la etiqueta anti-flag -8B5 VL-CB3.1 VH-LGGC. El ligador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh648R y se utilizó como molde la etiqueta anti-Flag-8B5VL-CB3.1 VH-VEPKSC. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

8B5-CB3.1-VEPKSC Secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 230):

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga       50
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg      250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga      400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca      550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc      600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta      650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt      700
gt                                                          702
```

8B5-CB3.1-VEPKSC Secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 231):

```
DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA       50
ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA      100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS      200
LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSVE PKSC                       234
```

CB3.1-8B5-FNRGEC Secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 232):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca       50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg      100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac      150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt      200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg      250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt      600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag      700
tctcctcgtt caacagggga gagtgt                                726
```

CB3.1-8B5-FNRGEC Secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 233):

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP      100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS      150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS      200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSFNRG EC              242
```

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

Se amplificó 8B5VL utilizando como cebadores H9 e Igh694R, ch8B5Lc como molde. 8B5VH se amplificó utilizando como cebadores Igh695F e Igh696R, ch8B5Hc como molde. La secuencia ligadora fue incorproada en los cebadores Igh694R e Igh695F. La molécula HuIgG1Fc se amplificó empleando como cebadores Igh355F e Igh366R, ch8B5Hc como molde. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en razones equimolares, luego amplificados utilizando como cebadores H9 e Igh366R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

8B5VL-CB3.1 VH-LGGC Secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 234):

```
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg      250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga      400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca      550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc      600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta      650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc          696
```

8B5VL-CB3.1 VH-LGGC Secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 235):

```
DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA       50
ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA      100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS      200
LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSLG GC                         232
```

CB3.1-8B5-LGGC Secuencia de nucleótidos (ID SEC NO: 236):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca       50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg      100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac      150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt      200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg      250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt      600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag      700
tctcctcgct gggaggctgc                                       720
```

CB3.1-8B5-LGGC Secuencia de aminoácidos (ID SEC NO: 237):

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP      100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS      150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS      200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSLGGC                 240
```

Cebadores:

Lgh628F (ID SEC NO: 238):

ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

Lgh629R (ID SEC NO: 239):

tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

Lgh630R (ID SEC NO: 240):

gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

Lgh631 F (ID SEC NO: 241):

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

Lgh640R (ID SEC NO: 242):

tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

Lgh644R (ID SEC NO: 243):

tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

Lgh646R (ID SEC NO: 244):

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

Lgh647F (ID SEC NO: 245):

caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

Lgh648R (ID SEC NO: 246):

tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

Expresión: Los plásmidos de expresión codificados por el constructo 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, (figura 30) fueron cotransfectados en células HEK-293 para expresar el DART 8B5-CB3.1 con o sin etiqueta anti-flag empleando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego empleando una columna de afinidad para CD32B.

ELISA: Se realizó el ensayo ELISA como sigue: 50 µl/pocillo de una disolución 2 µg/ml de CD32B-Fc fueron recubiertos en una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón carbonato a 4ºC durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1%) y luego se bloqueó con BSA al 0,5% en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la proteína de fusión de Fc monocatenaria a ensayar. Durante el bloqueo, el DART 8B5-CB3.1 fue diluido en una serie de diluciones dobles comenzando con 2 µg/ml. 25 µl/pocillo del DART diluido mezclados con 25 µl/pocillo de ch8B5 50 ng/ml fueron transferidos de la placa de dilución a la placa para ELISA. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, 50 µl/pocillo del fragmento $F(ab')_2$ anti-IgG humana producido en cabra $F(ab')_2$ conjugado a HRP, diluido 1:10.000 (Jackson ImmunoResearch) se añadió a la placa. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H_2SO_4 al 1%. Se leyó la DO450 nm empleando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura empleando el software GraphPadPrism 3.03 (figura 31).

6.10 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DART TETRAVALENTE DE TIPO Ig

Se emplearon cuatro cadenas polipeptídicas para producir una especie de DART de tipo Ig que tuviera sitios de unión a antígeno tetravalentes (figura 32; figura 33). La especie DART de tipo Ig tiene propiedades únicas, puesto que sus dominios pueden estar diseñados para unirse al mismo epítopo (para formar un DART de tipo Ig específico de un epítopo, tetravalente, con capacidad para unirse a cuatro moléculas de antígeno idénticas), o a diferentes epítopos o antígenos. Por ejemplo, sus dominios pueden estar diseñados para unirse a dos epítopos del mismo antígeno (para formar un DART de tipo Ig específico de dos epítopos, específico de un antígeno, tetravalente) o a epítopos de diferentes moléculas antigénicas para formar un DART de tipo Ig tetravalente que tenga un par de sitios de unión específicos para un primer antígeno y un segundo par de sitios de unión específicos para un segundo antígeno). Moléculas híbridas que tengan combinaciones con tales atributos pueden producirse fácilmente.

Para ilustrar las características de tal especie de DART de tipo Ig se produjo un DART de tipo Ig tetravalente a modo de ejemplo que tenía un par de sitios de unión específicos para CD32 y un segundo par de sitios de unión

específicos para CD16A. Esta especie DART de tipo Ig fue producida utilizando las siguientes cuatro cadenas polipeptídicas:

Secuencia de nucleótidos de 2.4G2-3G8-hKappa (ID SEC NO: 247):

```
gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga      50
aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag     100
cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat     150
gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc     200
tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg     250
gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct     300
gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca     400
gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt     450
gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca     500
catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac     550
tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc     600
agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc     650
cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac     700
tgggaggctg cggcggaggg agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc     750
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt     800
gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg     850
tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag     900
gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa     950
agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg    1000
gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt           1044
```

Secuencia de aminoácidos codificada 2.4G2-3G8-hKappa (ID SEC NO: 248):

```
DVQMTQSPSN LAASPGESVS INCKASESIS KYLAWYLQKP GKANKLLMYD      50
GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTIRSLEP EDFGLYYCQQ HYEYPATFGS     100
GTKLEIKGGG SGGGGQVTLK ESGPGILQPS QTLSLTCSFS GFSLRTSGMG     150
VGWIRQPSGK GLEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SSNQVFLKIA     200
SVDTADTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSLGGCGGG SRTVAAPSVF     250
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ     300
DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC       350
```

Secuencia de nucleótidos 3G8-2.4G2-hG1 (ID SEC NO: 249):

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca       50
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg      100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc      150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag      200
tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg      250
aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg      350
cggaggcgag gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg      400
gaaggtccct gaaactctcg tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac      450
tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca acgacgggtc tggagtgggt      500
cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga gactccgtga      550
agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg      600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac      650
agagactacg ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag      700
tttcagtcac tgtctcctca ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc      750
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc      800
tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac      850
cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc      900
ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt      950
gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga     1000
atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct     1050
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg     1100
gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga     1150
tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa     1200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa     1250
tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg     1300
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac     1350
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat     1400
ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc     1450
catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc     1500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca     1550
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct     1600
ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1650
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta     1700
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa                      1734
```

Secuencia de aminoácidos codificada 3G8-2.4G2-hG1 (ID SEC NO: 250):

```
DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL       50
LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQQSNEDPY      100
TFGGGTKLEI KGGGSGGGGE VELVESGGGL VQPGRSLKLS CAASGFTFSD      150
YYMAWVRQAP TTGLEWVASI SYDGGDTHYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL      200
QMDSLRSEDT ATYYCATETT GIPTGVMDAW GQGVSVTVSS LGGCGGGSAS      250
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT      300
FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS      350
CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE      400
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY      450
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV      500
KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ      550
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK                              578
```

Las preparaciones de moléculas de DART de tipo Ig con las secuencias anteriores fueron obtenidas de diferentes aislados de plásmidos y fueron denominadas “Ig DART 1” e “Ig DART 2.” La capacidad de estas especies DART de tipo Ig para unirse a mCD32-hCD16A en un ensayo ELISA se comparó con la del medio solo, un DART que tenía un solo sitio de unión a CD32 y un solo sitio de unión a CD16A (“DART”), y el anticuerpo Acm anti-ch-mCD32 de control (figura 34). Se encontró que el DART de tipo Ig de la presente invención tiene mucho mayor afinidad de unión a antígeno que cualquier DART o anticuerpo de control.

6.11 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DIACUERPOS BIESPECÍFICOS CD32B-CD79-1 Y CD32B-CD79-2

Los genes que codifican CD79VL-CD32B VH (Secuencia 1), CD32BVL-CD79VH-1 (Secuencia 2) y CD32BVL-CD79VH-2 (Secuencia 3) fueron clonados en el vector de expresión pEE13 obteniéndose los constructos de expresión 1, 2 y 3, respectivamente. El plásmido de expresión del constructo 1 fue cotransfectado junto con el plásmido de expresión 2 o 3 en células HEK-293 para preparar diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2, respectivamente. Se recogió el medio condicionado cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego utilizando una columna para afinidad de CD32B.

Se realizó el análisis de ELISA como sigue: 50 µl/pocillo de una disolución 2 µg/ml de CD32B-Fc se recubrió en placas Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 4ºC durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1%) y luego se bloqueó con BSA al 0,5% en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la proteína de fusión Fc monocatenaria a ensayar. Durante el bloqueo, el diacuerpo biespecífico CD32B-CD79-1 o CD32B-CD79-2 diacuerpo fue diluido en una serie de dilución doble comenzando con 2 µg/ml. 25 µl/pocillo del diacuerpo biespecífico diluido se mezclaron con 25 µl/pocillo de una disolución 50 ng/ml del anticuerpo anti-CD32B y se añadió a una placa para ELISA. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadió a la placa 50 µl/pocillo del fragmento del anticuerpo $F(ab')_2$ anti-IgG humana producido en cabra $F(ab')_2$ conjugado a HRP diluido 1:10.000 (Jackson ImmunoResearch). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo de sustrato TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H2S04 al 1%. Se leyó la DO450 nm empleando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Las lecturas se representaron gráficamente utilizando el software GraphPadPrism 3.03. El experimento reveló que los diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2 fueron capaces de unirse de manera inmunoespecífica a CD32-Fc con una afinidad equivalente a la del anticuerpo de control anti-CD32B. Las secuencias de nucleótidos y los aminoácidos codificados de los constructos antes descritos se proporcionan a continuación:

Secuencia 1 - secuencia de nucleótidos de CD79VL-CD32BVH (ID SEC NO: 251):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca      50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg     100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac     150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt     200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg     250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg     300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg     350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac     400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt     450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg     500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg     550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt     600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta     650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag     700
tctcctcgct gggaggctgc                                     720
```

Secuencia 2 – secuencia de aminoácidos CD79VL-CD32BVH (ID SEC NO: 252):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN      50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP     100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS     150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS     200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC               240
```

Secuencia 3 - secuencia de nucleótidos CD32BVL-CD79VH-1 (ID SEC NO: 253):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc         696
```

Secuencia 4 – secuencia de aminoácidos CD32BVL-CD79VH-1 (ID SEC NO: 254):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA      50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG     100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS     200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                        232
```

Secuencia 5 - secuencia de nucleótidos CD32BVL-CD79VH-2 (ID SEC NO: 255):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc         696
```

Secuencia 6 - secuencia de aminoácidos CD32BVL-CD79VH-2 (ID SEC NO: 256):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA      50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG     100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS     200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                        232
```

6.12 CONSTRUCCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS DIACUERPOS BIOFUNCIONALES H8B5-HBCRC

Se construyó un diacuerpo que contiene regiones variables capaces de unirse a CD32 y al complejo receptor de células B (“BCRC”).

Clonación. Se construyeron los constructos utilizando PCR convencional/PCR solapante:

PCR:

h8B5VL-G3SG4-hBCRCVH M48I-LGGC:

Un fragmento VL de 8B5 completamente humanizado (que reconoce CD32) se amplificó utilizando como cebadores

Igh321F e Igh788R. El fragmento M48I de hBCRCVH se amplificó empleando como cebadores Igh784F e Igh386R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí y amplificaron utilizando Igh321F e Igh386R. El fragmento de PCR solapante se clonó luego en pEE6 en el sitio XbaI-EcoRI. “G3SG4” es un ligador que tiene la secuencia: GGGSGGGG (ID SEC NO: 10).

hBCRCVL R45N-G3SG4-h8B5VH -LGGC

El fragmento R45N hBCRCVL se amplificó empleando como cebadores Igh321F e Igh785R. El dominio VH de h8B5 se amplificó empleando como cebadores Igh787F e Igh786R. Los productos de PCR se purificaron en gel y mezclados entre sí y amplificaron empleando Igh321F e Igh786R. El fragmento de PCR solapante se clonó luego en pEE13 en el sitio XbaI-EcoRI.

Construcción de vector simple. La proteína pEE6hHBCRCVL R45N-h8B5VH fue digerida en los sitios Bgl II-Sal I y se purificó un fragmento de 3.3kb que fue insertado en pEE13 hHBCRCVL 45N-h8B5VH en los sitios BamHI-SalI. La proteína Bgl II y BamH I comparten extremos cohesivos compatibles. La secuencia de DART y los cebadores utilizados para construir el DART se representan a continuación:

Secuencia de nucleótidos hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC (ID SEC NO: 257):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca      50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg     100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac     150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt     200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg     250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg     300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg     350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac     400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt     450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg     500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg     550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt     600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta     650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag     700
tctcctcgct gggaggctgc                                     720
```

Secuencia de aminoácidos R45N-h8B5VH-LGGC (ID SEC NO: 258):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN      50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP     100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS     150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS     200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC               240
```

Secuencia de nucleótidos H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC (ID SEC NO: 259):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc         696
```

Secuencia de aminoácidos H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC (ID SEC NO: 260):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA      50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG     100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS     200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                        232
```

Cebador Lgh321F (ID SEC NO: 261):

cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

Cebador Lgh386R (ID SEC NO: 262):

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45

Cebador Lgh784F (ID SEC NO: 263):

ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

Cebador Lgh785R (ID SEC NO: 264):

cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38

Cebador Lgh786R (ID SEC NO: 265):

tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

Cebador Lgh787F (ID SEC NO: 266):

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

El plásmido de expresión Hu3G8VL1-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC se cotransfectó junto con Hu2B6VL5-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC en células HEK-293 para preparar el diacuerpo bioespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 que reconoce CD32 y CD79. Al mismo tiempo, el plásmido Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC y el plásmido Hu3G8VL1-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC se cotransfectaron de manera individual en células HEK-293 para preparar el diacuerpo Hu2B6 4.5 y Hu3G8 5.1. Después de tres días de cultivo, el medio condicionado se recogió y caracterizó mediante análisis de ELISA de unión. El resultado de este experimento se representa en la figura 36.

Diseño experimental: 100 ng/pocillo de FcRIIb-G2-Agly soluble fueron recubiertos en una placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 40ºC durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS/Tween 20 al 0,1% y luego se bloqueó con BSA al 0,5% en PBS/Tween 20 al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir diacuerpos. A cada pocillo se le añadió una serie de diluciones dobles del medio condicionado del diacuerpo bioespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1, el diacuerpo Hu2B6 4.5 y el diacuerpo hu3G8 5.1, comenzando en 25 ng/pocillo. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó después con PBS/Tween 20 al 0,1% tres veces, se añadió a la placa 10 ng/pocillo de FcRIIIa-G2-Biotina. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavada con PBS/Tween 20 al 0,1% tres veces, para la detección se utilizaron 50 µl de una dilución 1:5000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech). Después de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavó la placa con PBS/Tween 20 al 0,1% tres veces y se desarrolló utilizando el sustrato TMB. Después de 10 minutos de incubación, la reacción se detuvo con H_2SO_4 al 1%. Se leyó la DO450 nm con el programa SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura utilizando el software GraphPadPrism 3.03.

6.13 CONSTRUCTO DE LOS DIACUERPOS IgDART

Los diacuerpos IgDART fueron construidos con regiones variables con capacidad para unirse a CD32 y al complejo receptor de células B ("BCRC"). El primer diacuerpo empleó un ligador LGGCGGGS (ID SEC NO: 267) entre las secuencias de VH y las secuencias de Fc de la molécula. El segundo diacuerpo empleó un ligador LEIK que tenía la secuencia: LEIK (ID SEC NO: 268) o un ligador TVSS que tenía la secuencia TVSS (ID SEC NO: 269). Las secuencias de las cadenas de estos diacuerpos y los polinucleótidos codificantes se presentan a continuación:

H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

(ID SEC NO: 270):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA      50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG     100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS     200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GCGGGSRTVA APSVFIFPPS     250
DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS     300
TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC            343
```

Las secuencias de H8B5VL se fusionan a las secuencias de hBCRCVH mediante el ligador GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) ubicado en la posición 108-115. Las secuencias de hBCRCVH se fusionan a las secuencias de Fc con el ligador LGGCGGGS (ID SEC NO: 267) ubicado en la posición 229-236 (ambas mostradas subrayadas en lo anterior). El polinucleótido que codifica la secuencia de H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K LGGCG3_hKappa es el siguiente: (ID SEC NO: 271):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg     700
gagggagccg aactgtggct gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct     750
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa     800
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc     850
aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc     900
acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa    1000
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg    1050
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag                       1082
```

donde las secuencias que codifican los ligadores: GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) y LGGCGGGS (ID SEC NO: 267) se ubican en la posición 322-345 y 685-708, respectivamente (ambas se muestran subrayadas en lo anterior).

HBCRCVL R45N-h8B5 VH_LGGCGGGS-hG 1

(ID SEC NO: 272):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN      50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP     100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS     150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS     200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC GGGSASTKGP     250
SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV     300
LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT     350
HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV     400
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV     450
SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY     500
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF     550
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK                                574
```

Las secuencias de hBCRCVL se fusionan a las secuencias de H8B5VH con el ligador GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) ubicado en la posición 113-120. Las secuencias de H8B5VH se fusionan a las secuencias Fc con el ligador LGGCGGGS (ID SEC NO: 267) ubicado en la posición 237-244 (ambas se muestran subrayadas en lo anterior). El polinucleótido que codifica la secuencia HBCRCVL R45N-h8B5 VH_LGGCGGGS-hG 1 es el siguiente: (ID SEC NO: 273):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca        50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg       100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac       150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt       200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg       250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg       300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg       350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac       400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt       450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg       500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg       550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt       600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta       650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg       700
tctccagcct gggaggctgc ggcggaggga gcgcctccac caagggccca       750
tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc       800
ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt       850
cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc       900
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc       950
cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca      1000
gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact      1050
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt      1100
cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc      1150
ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc      1200
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa      1250
gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca      1300
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc      1350
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa      1400
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg      1450
agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat      1500
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa      1550
ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct      1600
acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc      1650
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag      1700
cctctccctg tctccgggta aa                                   1722
```

donde las secuencias que codifican los ligadores: GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) y LGGCGGGS (ID SEC NO: 267) están ubicadas en la posición 337-360 y 709-732, respectivamente (ambas se muestran subrayadas en lo anterior).

H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

(ID SEC NO: 274):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA        50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG       100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN       150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS       200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT       250
ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL       300
TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC                      335
```

Las secuencias de H8B5VL se fusionan a las secuencias de HBCRCVH con el ligador GGGSGGGG (ID SEC NO:

10) ubicado en la posición 108-115. Las secuencias de HBCRCVH se fusionan a las secuencias de Fc con el ligador LEIK (ID SEC NO: 268) ubicado en la posición 225-228 (ambas se muestran subrayadas en lo anterior). El polinucleótido que codifica la secuencia de H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa es el siguiente:

(ID SEC NO: 275):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac     700
catcggtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact     750
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt     800
acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg     850
tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg     900
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt     950
cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag    1000
agtgt                                                     1005
```

donde las secuencias que codifican los ligadores: GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) y LEIK (ID SEC NO: 268) están ubicadas en la posición 322-345 y 673-684, respectivamente (ambas se muestran subrayadas en lo anterior).

HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

(ID SEC NO: 276):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN      50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP     100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS     150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS     200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS     250
SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS     300
LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA     350
PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG     400
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP     450
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW     500
ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA     550
LHNHYTQKSL SLSPGK                                          566
```

Las secuencias de HBCRCVL se fusionan a las secuencias de h8B5VH con el ligador GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) ubicado en la posición 113-120. Las secuencias de h8B5VH se fusionan a las secuencias de Fc con el ligador TVSS (ID SEC NO: 269) ubicado en la posición 233-236 (ambas se muestran subrayadas en lo anterior). El polinucleótido que codifica la secuencia de HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 es el siguiente: (ID SEC NO: 277):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca       50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg      100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac      150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt      200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg      250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt      600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg      700
tctccagcgc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc      750
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga      800
ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca      850
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      900
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta      950
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag     1000
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca     1050
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa    1100
ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg     1150
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc     1200
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag     1250
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga     1300
atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc     1350
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt     1400
gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc     1450
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg     1500
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct     1550
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga     1600
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct     1650
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa       1698
```

donde las secuencias que codifican los ligadores: GGGSGGGG (ID SEC NO: 10) y TVSS (ID SEC NO: 269) están ubicadas en la posición 337-360 y 697-708, respectivamente (ambas se muestran subrayadas en lo anterior).

6.14 OPTIMIZACIÓN DE LOS LIGADORES

Como ya se describió, los diacuerpos IgDART de la presente invención preferiblemente contienen ligadores entre las secuencias de VH y las secuencias del Fc de la molécula. Los experimentos se realizaron para optimizar los ligadores con el fin de llevar al máximo el rendimiento y la actividad. Se emplearon los siguientes ligadores:

ID SEC NO:	Ligador
278	FNRGECGGGS
279	FNRGECLQVYYRM
280	LEGEEG

281	LEGEEGC
282	LEIK
283	LGEEG
284	LGEEGC
285	LGGCGGGS
286	LGKKG
287	LGKKGC
288	LKGKKG
289	LKGKKGC
290	LQVYYRM
291	LQVYYRMC
292	TVSS
293	VEPKSCGGGS
294	VEPKSCYLYLRARV
295	VQVHYRM
296	VQVHYRMC
297	YLYLRARV
298	YLYLRARVC

Los ligadores anteriores fueron introducidos en plásmidos con el fin de preparar una serie de diacuerpos IgDART que tienen diferentes combinaciones de ligadores:

Plásmido pMGX	**ID SEC NO del ligador cadena A**	**pEE13.4**	**ID SEC NO ligador cadena B**	**pEE6.4**	**ELISA (µg/ml)**	**Proteína purificada (después de SEC) (1 litro)**
900	285	√	285	√	0.799	0.3 mg
901	283	√	286	√	0.628	0.4 mg
902	284	√	287	√	0.896	0.47 mg
903	280	√	288	√	0.557	
904	281	√	289	√	0.450	0.4 mg
905	293	√	278	√	0.360	
906	294	√	279	√	N/A	
907	282	√	292	√	N/A	
908	297	√	295	√	0.428	0.2 mg
909	297	√	290	√	0.305	0.3 mg
910	298	√	296	√	N/A	
911	298	√	291	√	0.218	

Se determinaron las propiedades de agregación de los IgDART producidos.

IgDART ligadores	Proteína total (mg)	Oligómero %	Monómero %	Fragmento %	Rango SB
900A/900B	0.51	12	45	43	4
901A/901B	0.72	5	83	12	1
902A/902B	0.78	21	48	31	4
903A/903B	0.5	3	84	13	1
904A/904B	0.66	16	65	26	4
905A/905B	0.5	20	60	20	3
908A/908B	0.5	13	65	17	2
908A/909B	0.38	22	50	28	3
910A/911B	0.2	45	10	45	5

Los datos mostraron sorprendentemente que los constructos que tienen ligadores, como los que se emplearon en 901A/901B; 903A/903B; y 908A908B dieron resultados evidentemente superiores (menos oligomerización y/o menos producción de fragmentos) que los constructos que tenían ligadores, como 910A/911B.

6.15 DART CON OVILLO E / OVILLO K

Como se apreciará respecto a lo antes mencionado, cada uno de los polipéptidos de un DART biespecífico puede formar dos especies de homodímeros y una especie de heterodímero. En una realización de la presente invención, un polipéptido con carga puede ser añadido al extremo C-terminal de uno, o más preferiblemente, ambos polipéptidos DART. Al seleccionar polipéptidos con carga contraria para cada uno de los polipéptidos de DART biespecífico, la inclusión de tales polipéptidos con carga favorece la formación de heterodímeros y menos formación de homodímeros. Preferiblemente, un polipéptido con carga positiva contendrá una cantidad considerable de arginina, glutamina, histidina y/o lisina (o mezclas de estos aminoácidos) y un polipéptido con carga negativa contendrá una cantidad considerable de aspartato o glutamato (o una mezcla de estos aminoácidos). Los polipéptidos con carga positiva que contienen una cantidad considerable de lisina y los polipéptidos con carga negativa que contienen una cantidad considerable de glutamato son particularmente preferidos. Con el fin de llevar al máximo la atracción electrostática entre tales polipéptidos con carga contraria, se prefiere emplear polipéptidos que puedan asumir espontáneamente una conformación helicoidal.

Por tanto, en una realización preferida, un polipéptido con carga positiva, “ovillo E” será anexado a los polipéptidos que se utilicen para formar un DART biespecífico, y un polipéptido con carga negativa “ovillo K” será anexado al segundo de los polipéptidos de DART (figura 37).

Un polipéptido de ovillo E particularmente preferido tiene la secuencia: $(EVAALEK)_4$:

ID SEC NO: 299 EVAALEKEVAALEKEVAAJLEKEVAALEK

Un polipéptido de ovillo E particularmente preferido tendrá la secuencia: $(KVAALKE)_4$:

ID SEC NO: 300 KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Un polipéptido DART preferido que presente tal secuencia de ovillo E tendrá la secuencia general: [dominio VL]-[GGGSGGGG]-[dominio VH]-$[(EVAALEK)_4]$-GGGNS, cuando VL es el dominio Ig de cadena ligera variable de DART, GGGSGGGG es ID SEC NO: 10, VH es el dominio Ig de cadena pesada variable de DART, $(EVAALEK)_4$ es ID SEC NO: 299, y GGGNS es la ID SEC NO: 301. Un polipéptido DART preferido que presente tal secuencia de ovillo K tendrá la secuencia general: [dominio VL]-[GGGSGGGG]-[dominio VH]-[(KVAALKE)4]-GGGNS, cuando VL es el dominio Ig de cadena ligera variable de DART, GGGSGGGG es la ID SEC NO: 10, VH es el dominio Ig de cadena pesada variable de DART, $(KVAALKE)_4$ es la ID SEC NO: 300, y GGGNS es la ID SEC NO: 301.

6.16 DART QUE CONTIENEN EL FRAGMENTO Fc CON OVILLO E / OVILLO K

En otra realización, pueden ligarse regiones Fc a los polipéptidos de ovillo E y/o K de los DART con ovillo E u ovillo K.

Además la separación entre las regiones Fc y el dominio VH de DART de un DART que contenga Fc es deseable en casos en los que una disposición menos separada de tales dominios da como resultado una interacción disminuida entre tales dominios y sus ligandos de unión o de otro modo interfiere con el ensamblaje de DART. Aunque es posible emplear separadores de cualquier secuencia de aminoácidos, se prefiere emplear separadores que formen

ovillos de hélice α, con el fin de extender al máximo y proyectar el dominio Fc lejos de los dominios variables (figura 37). Debido a que los polipéptidos en ovillo antes descritos de carga contraria además funcionan para favorecer la formación del heterodímero, tales moléculas son separadores particularmente preferidos. Tales moléculas Fc-DART que contienen ovillos proporcionan beneficios similares a los de los Fc-DART, incluida una semivida en suero y reclutamiento de la función efectora mejorados. Los polipéptidos de ovillo E y ovillo K antes descritos para este propósito son particularmente preferidos.

Por tanto, en una realización preferida, el DART que contiene Fc con ovillo E tendrá la secuencia general: [dominio V]-[GGGSGGGG]-[dominio VH]-[(EVAALEK)$_4$]-GGG-dominio Fc comenzando en D234 (numeración Kabat), cuando VL es el dominio Ig de cadena ligera variable de DART, GGGSGGGG es la ID SEC NO: 10, VH es el dominio Ig de cadena pesada variable de DART y (EVAALEK)$_4$ es la ID SEC NO: 299.

Del mismo modo, en una realización preferida, el DART que contiene Fc con ovillo E tendrá la secuencia general: [dominio VL]-[GGGSGGGG]-[domino VH]-[(KVAALKE)$_4$]-GGG-dominio Fc comenzado en D234 (numeración Kabat), cuando VL es el dominio Ig de cadena ligera variable de DART, GGGSGGGG es la ID SEC NO: 10, VH es el dominio Ig de cadena pesada variable de DART y (KVAALKE)$_4$ es la ID SEC NO: 300.

Como se indica en lo anterior, una molécula de DART que contenga ovillos o una molécula de DART que contenga ovillos o una molécula de DART que contenga Fc que contenga ovillos puede contener solo uno de tales separadores en ovillo o puede contener más de uno de tales separadores (por ejemplo, dos separadores, preferiblemente de carga contraria, de los que está unido uno a cada dominio VH de los polipéptidos de DART). Mediante la unión de la región Fc de tal(es) molécula(s) separadora(s), se potencia la capacidad para preparar versiones bivalentes, tetravalentes, etc. De las moléculas Fc-DART cambiando la cedena (figura 39). Como se muestra en la figura 39, es posible producir moléculas de Fc-DART que formen monómeros o dímeros, dependiendo de si el dominio Fc está unido a uno o ambos de los dominios VH de DART.

6.17 ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LOS DART QUE CONTIENEN Fc CON OVILLO E / OVILLO K

Se produjeron especies de ovillo E y/o ovillo K Fc-DART a partir de moléculas de DART biespecíficas que tenían: (1) las regiones ligera y pesada variables del anticuerpo reactivo para CD79b (el complejo BCR), CB32, y (2) las regiones ligera y pesada variables de una variante de baja afinidad (denominado variante “YA”) del anticuerpo reactivo para CD32B, 2B6. Esta región variable de cadena ligera de este anticuerpo difiere de la del anticuerpo 2B6 en que contiene las mutaciones: N50Y y V51A. Por tanto, el anticuerpo YA2B6 tiene una secuencia de la región variable de cadena ligera:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASE
SISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFTFGGGTKVEI

K (ID SEC NO: 302).

La secuencia de la región variable de cadena pesada variable de este anticuerpo es:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWMGVIDP
SDTYPNYNKKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDYYS
GMDYWGQGTTVTVSS

(ID SEC NO: 303); o

Se eligió el anticuerpo de baja afinidad puesto que preferentemente se unirá a CD32B en cis en células que expresen CD79b (células B). Como tal, la configuración disminuirá la interacción con otras células que expresen CD32B (monocitos, células endoteliales, hígado) así como la interacción trans no deseada.

Los derivados con ovillo E y/o ovillo K y los derivados que contienen ovillo E y/o ovillo K Fc de tales DART h2B6YAhCB3 fueron preparados. Se utilizó cromatografía de exclusión molecular para analiza el tamaño aproximado y la heterogeneidad de las moléculas producidas. Como se muestra en la figura 40, se formaron los dímeros a partir de los DART con ovillo E / ovillo K que tenían una sola región Fc ligada a un dominio de ovillo K así como a los DART con ovillo E / ovillo K que tenían una sola región Fc ligada a un dominio de ovillo E. El monómero deseado, así como moléculas diméricas fueron recuperados de las preparaciones en las que las regiones Fc estaban ligadas a los ovillos E y K de la misma molécula de DART, siendo el monómero el producto mayoritario que se formó. La figura 41 muestra la posible estructura de las moléculas diméricas producidas.

Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular fueron analizadas empleando electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para analizar adicionalmente las estructuras de las moléculas producidas (figura 42). Los derivados de DART con ovillo E / ovillo K (sin región Fc) migraron como dos bandas predominantes cada una de

aproximadamente 28 kD (correspondientes al polipéptido que comprendía KFc y el polipéptido que comprendía EFc ligeramente más pequeño) y una banda menos prominente a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART ovillo E / ovillo K). Las fracciones monoméricas de los derivados de DART que comprendían ovillo E / ovillo K (EFc/K o E/KFc) derivados de la cromatografía de exclusión molecular mostraron solamente la banda de mayor o menor peso molecular a aproximadamente 28 kD (correspondiente a cuando el DART era el DART que comprendía KFc (banda de mayor peso molecular) o el DART que comprendía EFc (banda de menor peso molecular). El material migró principalmente a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART con ovillo E / ovillo K). También se observaron bandas de peso molecular significativamente superior.

Se realizó un análisis de ELISA de unión biespecífica para caracterizar las moléculas producidas. Se puso CD79 en una placa para ELISA. Los DART se unieron después a la placa. La unión de DART se detectó empleando sCD32B-biotina seguida por incubación con estreptavidina-HRP. Como se muestra en la figura 43, los derivados de DART h2B6YAhCB3 que comprendían ovillo E / ovillo K Fc (EFc/K o E/KFc) mostraron una potenciación significativa de la unión respecto al DART h2B6YAhCB3, o a un derivado de DART EFc KFc h2B6YAhCB3.

La reticulación de los anticuerpos que se han unido a CD79b da origen a la activación de células B (Van Kooten, C. *et al*. (1997) "*Cross-Linking Of Antigen Receptor Via Ig-B (B29, CD79b) Can Induce Both Positive And Negative Signals In CD40-Activated Human B Cells*", Clin. Exp. Immunol. 110:509-515). Puesto que las moléculas de DART h2B6YAhCB3 son capaces de unirse a CD79b y al receptor inhibidor CD32B, estas tienen la capacidad para "reclutar" las moléculas CD32B a los sitios de unión de CD79b, y con ello bloquear la proliferación de células B. Para demostrar esta capacidad, los DART fueron incubados con células B que habían sido expuestas a anticuerpos capaces de formar reticulación con los anticuerpos anti-CD79b unidos. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 44. Los resultados muestran que los anticuerpos dirigidos solamente contra CD79b o CD32B (Ch2B6N297Q y ChCB3.1N297Q, respectivamente) no pudieron inhibir la proliferación de células B. Los derivados de DART EFc/KFc h2B6YA x hCB3 fueron sustancialmente más eficaces para inhibir la proliferación de células B, en comparación con el propio DART h2B6YA x hCB3 y el control h2B6YA x hCB3 VF. Se encontró que los DART con ovillo E / ovillo K que solo tenían una sola región Fc unida (los derivados de DART E/KFc h2B6YA x hCB3 y los derivados de DART EFc/K h2B6YA x hCB3) ejercen la inhibición más grande en la proliferación de células B.

6.18 MODIFICACIONES DART PARA ALTERAR LA SEMIVIDA EN SUERO *IN VIVO*

Como se describe en lo anterior, las moléculas de anticuerpo recombinantes pequeñas como pueden ser las moléculas monocatenarias biespecíficas (por ejemplo, las que presentan una masa molecular de aproximadamente 55 kDa) se aclaran rápidamente de la circulación. En estudios farmacocinéticos *in vivo* de las moléculas de DART en ratones mostraron la semivida terminal breve prevista de aproximadamente 2 horas.

En algunas realizaciones, como puede ser durante el tratamiento de un estado inflamatorio agudo, tal semivida corta es deseada, no obstante, en otras realizaciones, como puede ser para el tratamiento de cáncer y enfermedades o estados crónicos, se prefiere que las moléculas de DART de la presente invención tengan semividas más prolongadas.

Con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de las moléculas de DART para tales usos, las moléculas de DART pueden modificarse para que contengan una parte polipeptídica de una proteína de unión al suero en uno o más de los extremos terminales de la molécula de DART. Más preferiblemente, tales partes polipeptídicas de una proteína de unión al suero será instalada en el extremo C-terminal de la molécula de DART. Una parte polipeptídica particularmente preferida de una proteína de unión al suero para este propósito es el dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína G estreptocócica. El dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de estreptococos es particularmente preferido.

El dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de estreptococos consiste en 46 residuos de aminoácidos que forman un haz de triple hélice estable y tienen especificidad de unión a albúmina amplia (Johansson, M.U. *et al*. (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). La albúmina es la proteína más abundante en plasma y tiene una semivida de 19 días en humanos. La albúmina presenta diversos sitios de unión a moléculas pequeñas que le permiten formar unión no covalente con otras proteínas y con ello ampliar sus semividas en suero.

Para demostrar la capacidad de una parte polipeptídica de una proteína de suero para prolongar la semivida de un DART, el dominio ABD3 de la proteína G estreptocócica se fusionó a un DART biespecífico recombinante (inmunorreactivo con los antígenos hCD16 y hCD32B) para producir una molécula de anticuerpo recombinante, hCD16-hCD32B ABD-DART (figura 45). Este ABD-DART mostró unión específica a ambos antígenos así como con la albúmina sérica humana (HSA) y pudo redirigir células efectoras *in vitro*. En comparación con el DART de control, este ABD-DART mostró un fuerte aumento de la semivida en suero en ratones. Este enfoque puede utilizarse como una vía viable para aumentar la semivida de productos farmacéuticos potencialmente importantes tipo DART a más de 90 minutos, más de 2 horas, más de 5 horas, más de 10 horas, más de 20 horas y más preferiblemente más de 30 horas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Diseño y construcción del ABD DART: La molécula hCD16-hCD32B ABD DART se preparó utilizando como cadena 1:

hCD16VL-G3SG4-hCD32BVH-coil [$(VAALKE)_4$]

donde CD16VL indica el fragmento CD16VL de 3G8, G3SG4 indica la ID SEC NO: 10, hCD32BVH indica el fragmento CD32BVH de 2B6, y $(KVAALKE)_4$ indica la ID SEC NO: 300; y como cadena 2:

hCD32BVL-G3SG4 -hCD16VH-GGCGGG-ovillo E [$(EVAALEK)_4$] -GGGNS-ABD

donde CD32BVL indica CD32BVL, G3SG4 indica la ID SEC NO: 10, hCD16VH indica CD16VH, GGCGGG es los residuos 2-7 de la ID SEC NO: 267, ovillo E [$(EVAALEK)_4$] es la ID SEC NO: 299, GGGNS es la ID SEC NO: 301, y el dominio ABD es:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALID EILAALP (ID SEC NO: 304)

Por consiguiente, la secuencia de la cadena 1 (h3G8VLl-G3SG4-h2B6VH4-ovillo K-GGGNS) es:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YWIHWVRQAP GQGLEWIGVI DPSDTYPNYN KKFKGRVTMT VVVSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCARNGD SDYYSGMDYW GQGTTVTVSS GGCGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKEGGGNS

(ID SEC NO: 305)

Un polinucleótido preferido que codifica la cadena 1 (h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-ovillo K-GGGNS) es el siguiente:

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat
tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc
ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag
aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct

(ID SEC NO: 306)

Por consiguiente, la secuencia de la cadena 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-ovillo E-GGGNS-ABD) es:

EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT FTCRTSQSIG TNIHWYQQKP DQSPKLLIKE
VSESISGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAATYYCQQ SNTWPFTFGG
GTKVEIKGGG SGGGGQVTLR ESGPALVKPT QTLTLTCTFS GFSLSTSGMG
VGWIRQPPGK ALEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SKNQVVLTMT
NMDPVDTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA
LEKEVAALEK EVAALEKGGG NSLAEAKVLA NRELDKYGVS DYYKNLINNA

KTVEGVKALI DEILAALP (ID SEC NO: 307)

Un polinucleótido preferido que codifica la cadena 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-ovillo E-GGGNS-ABD) es el siguiente:

```
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca
gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga
gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct
gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag
gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc
aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa
gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag
gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc
aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca
aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct
```

(ID SEC NO: 308)

Cada segmento VL y VH se amplificó por PCR empleando como molde el DART hCD16-hCD32B. Para la cadena 2, las secuencias de nucleótidos que comprendían ovillo E y ABD fueron formadas mediante el dímero cebador y luego subclonadas en el extremo C-terminal de la región VH del hCD16 empleando digestión con enzimas de restricción y ligación. Ambas cadenas fueron clonadas en el vector pCIneo (Promega, inc.) en los sitios NheI-NotII. Cada uno de los plásmidos que albergaban la cadena 1 respectiva digerida en NgoMIV-NheI y los casetes de expresión de la cadena 2 digeridos en los sitios BstBI-PmeI fueron luego clonados en un solo plásmido para transfección en células CHO para generar líneas celulares estables.

Expresión y purificación de la proteína: Para realizar la transfección estable, se cotransfectaron células CHO-S con el ADN plásmido de DART hCD16-hCD32B EK ABD-DART. La proteína ABD-DART fue purificada por cromatografía de afinidad empleando la versión soluble del antígeno FcRIIB acoplado a la resina Sepharose 4B activada con CNBr. La proteína concentrada además fue purificada por cromatografía de exclusión molecular empleando la columna Superdex 200HR 10/30.

Ensayo de unión por ELISA: Para la captura a base de CD-16, las placas fueron recubiertas con el antígeno FcRIIB a una concentración de 2 µg/ml a 4ºC durante la noche. Las placas después fueron bloqueadas con peptona al 0,5% en PBS-T. Las proteínas purificadas diluidas en diluciones en serie dobles fueron unidas a la placa durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se realizó la detección utilizando CD32B biotinilado (50 ng/ml) seguido por estreptavidina conjugada con HRP (1/1000, BD-Pharm). Se midió la actividad de la HRP con la adición de TMB y se leyó la placa en un lector de placas a DO450nm.

Para la captura de albúmina sérica humana (HSA), las placas fueron recubiertas con HSA a una concentración de 2 µg/ml a 4ºC durante la noche. Después se siguió el mismo procedimiento para realizar el ensayo ELISA de doble afinidad.

Ensayo ADCC en el que participan células mononucleares de sangre periférica: Se midió la citotoxicidad con el ensayo de liberación de LDH. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre humana completa (Lonza Walkersville, Inc, Gaithersburg, MD) por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante. 2 x 10^4 células diana se sembraron en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo. Una dilución en serie de 1 a 4 de diferentes moléculas de DART o anticuerpo se añaden a las células en la placa. Después de eso, se añadió a los mismos pocillos 6 x 10^5 células PBMC. Luego se incuba la placa durante la noche a 37ºC y el 5% de CO_2 en el incubador. Luego se centrifugó la placa a 1200 rpm durante 5 minutos, 50 µl del sobrenadante se transfirieron a una placa para ELISA de fondo plano. 50 µl de la disolución del sustrato LDH (Promega) se añaden a cada pocillo y la placa se incuba durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Después 50 µl de disolución para detener la reacción se añaden a cada pocillo y la placa se lee a 490 nm en el lapso de una hora. El porcentaje de citotoxicidad de cada pocillo se calcula con la lectura de la densidad óptica sin ningún otro tratamiento como:

(muestra - AICC)/(diana máx. – diana espontánea) x 100

donde AICC es la citotoxicidad celular independiente de anticuerpos. La curva dosis frente a respuesta se genera utilizando software Prism.

Estudio farmacocinético: A ratones C57B1/6 se les inyectó una sola inyección intravenosa de DART hCD16-hCD32B a una concentración de 5mg/kg. Se recogió el suero de los ratones antes de la dosis, a los 2, 30 min; 1, 3, 6, 24 y 72 h. Se cuantificó la concentración de DART hCD16-hCD32B en suero. Se realizaron cálculos farmacocinéticos de DART hCD16-hCD32B por medio de un paquete de software farmacocinético WinNonlin Professional 5.1 (Pharsight Corporation, EUA). Se determinaron los parámetros mediante análisis no compartimental (NCA). El análisis no compartimental se basó en un modelo (Modelo 201) que requería una inyección intravenosa del fármaco. Para el cálculo del parámetro se utilizó el método trapezoidal lineal.

RESULTADOS

Expresión y estudio de unión por ELISA: La molécula de ABD-DART 16-hCD32B fue expresada eficientemente a una concentración de 6,5 mg por litro en células CHO-S de mamífero. La actividad de la unión de la proteína ABD-DART purificada unida a los antígenos respectivos se sometió a ensayo mediante ELISA. Los resultados mostraron que la proteína ABD-DART hCD16-hCD32B se une simultáneamente a ambos antígenos, CD16 así como con CD32B (figura 46A). El perfil de la unión coincide con la unión de la proteína DART hCD16-hCD32B control. La afinidad de la proteína ABD-DART hCD16-hCD32B purificada para albúmina sérica humana (HSA) también fue demostrada por ELISA (figura 46B). El resultado mostró una fuerte unión de la fusión de ABD DART a HSA, mientras que no se observó unión con el DART hCD16-hCD32B de control. Para demostrar que la molécula de ABD-DART fue capaz de unirse simultáneamente a CD32B, CD16A y HSA, una inyección de la proteína ABD-DART sobre la superficie con HSA inmovilizada estuvo seguida por inyecciones subsiguientes de CD32B 200nM y CD16A(F158) 200nM (figura 46C, línea continua). En el experimento de control (figura 46C, línea discontinua) los antígenos fueron sustituidos por tampón. Los resultados muestran que la molécula de ABD-DART fue capaz de unirse simultáneamente a CD32B, CD16A y HSA.

Se encontró que la proteína ABD-DART hCD16-hCD32B y su derivado de fusión de ABD presentan unión equivalente a CD32B soluble (sCD32B) y a CD16A(158F) soluble (sCD16A); es posible distinguir fácilmente los DART por la capacidad de la fusión DART ABD para unirse a albúmina sérica humana (HSA); (figuras 46D-46I). Los DART fueron incubados en placas recubiertas con CD16A y se detectó la unión utilizando sCD32B biotinilado en presencia o ausencia de HSA 3 mg/ml (el bloqueo se realizó con peptona al 0,5% en PBS-T). Se encontró que la fusión DART ABD conservaba la unión biespecífica de DART parental, y presentaba unión a sCD16A y CD32B que no se afectó por la presencia de albúmina sérica humana (figura 46J).

Citotoxicidad in vitro de la proteína ABD-DART: Con el fin de demostrar la unión simultánea de esta molécula de ABD-DART biespecífica a dos antígenos, uno en células efectoras y otro en una célula diana, se realizó el ensayo de aniquilación celular redirigida. Empleando células PBMC humanas como células efectoras, la molécula de ABD-DART hCD16-hCD32B indujo citotoxicidad potente, dependiente de la dosis contra líneas celulares B positivas para CD32B, Daudi (figura 47A). El resultado mostró que la potencia de la molécula de ABD-DART fue equivalente a la de DART parental. El DART CD16xCD32B puede unirse a las células efectoras que expresen CD16B y con ello reclutar estas células para aniquilar (por aniquilación redirigida) células que expresen CD32B. De este modo, se encontró que el DART CD16xCD32B presenta aniquilación potente contra células Raji (figura 47B).

Propiedades farmacocinéticas de la proteína ABD-DART: Las propiedades farmacocinéticas de la proteína ABD-DART hCD16-hCD32B fueron analizadas mediante análisis de ELISA de muestras de suero después de una sola dosis de inyección i.v. en ratones C57B1/6 (figura 48). Ambas proteínas, DART y ABD-DART mostraron eliminación bifásica de la circulación. El estudio PK de la proteína ABD-DART mostró un tiempo de circulación prolongado, con una semivida terminal aumentada de 35,1 h en comparación con 1,2 h de DART convencional (figura 48, Tabla 17). La mejora de las propiedades farmacocinéticas también se demostró por comparación del área bajo la curva (AUC). Para el constructo ABD-DART el AUC aumentó en un factor de casi 30 después de la fusión a ABD (Tabla 17).

TABLA 17

	ABD-DART	DART
T ½ (h)	35,1	1,2
Cmáx (µg/ml)	156,3	103,7
Tmáx (h)	0,5	0,033
AUC	4408,2	138,3

Actividad biológica in vivo de la proteína ABD-DART: Con el fin de demostrar que la proteína ABD-DART hCD16-hCD32B retuvo la actividad biológica *in vivo*, una sola dosis de la proteína ABD-DART o su DART parental fue administrada a ratones transgénicos Tg (mCD16-/-hCD16A+32B+) y se revisaron las concentraciones de células B,

células T y células PM. Los resultados indican que los DART fueron capaces de reducir las concentraciones de células B (figura 49A) y se interpretaron como indicadores de que se logró una aniquilación redirigida, orientada de células B *in vivo* hasta que los DART fueron retirados de la circulación del ratón. Las concentraciones de células T (figura 49B) y de células PM (figura 49C) no fueron reducidas con los DART, confirmando su especificidad.

En resumen, un dominio de unión a albúmina fusionado a la proteína DART (a la que se hace referencia como proteína ABD-DART) fue diseñada y producida satisfactoriamente. Se encontró que la proteína ABD-DART hCD16-hCD32B conserva las especificidades frente a sus dos determinantes antigénicos reconocidos: CD16 y CD32B. Se encontró que la proteína ABD-DART presenta alta afinidad con albúmina sérica humana. La fusión de ABD no disminuyó la actividad biológica (es decir, la potencia de DART para presentar aniquilación redirigida de células tumorales). La fusión de la molécula de DART al dominio ABD produjo una mejora considerable (aumento) en su semivida *in vivo*, y consiguió este objetivo sin un aumento drástico de su tamaño. La posibilidad de conservar un tamaño pequeño es significativa y ventajosa puesto que facilita la capacidad de la proteína DART para difundirse en los tejidos tumorales.

6.19 DART FRENTE A Her2 / RECEPTOR DE CÉLULAS B

Se construyó un diacuerpo IgDART que contenía regiones variables capaces de unirse a Her2/neu y al receptor de células T ("TCR").

Como se describe en lo anterior, el TCR es expresado de manera nativa por las células CD4+ o CD8+ y permite que tales células reconozcan péptidos antigénicos que estén unidos y sean presentados por las proteínas del MHC clase I o clase II de células presentadoras de antígeno. El reconocimiento de un complejo pMHC (péptido-MHC) por un TCR inicia la propagación de una respuesta inmunitaria celular que da origen a la producción de citocinas y la lisis de la célula presentadora de antígeno. HER2/neu, un miembro importante de la familia ErbB, ha sido investigado extensamente por su función en diversos carcinomas humanos y en el desarrollo de los mamíferos. (Hynes y Stern (1994) Biochim. et Biophys. Acta 1198: 165-184; y Dougall *et al*. (1994) Oncogene 9:2109-2123; Lee *et al*. (1995) Nature 378:394-398). El gen HER2/neu humano y la proteína HER2/neu se describen en Semba *et al*. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82:6497-6501 y Yamamoto *et al*. (1986) Nature 319:230-234, y la secuencia está a la disposición en el GenBank con número de registro X03363. La molécula de HER2/neu comprende cuatro dominios: un dominio extracelular al que se une el ligando; un dominio transmembrana lipófilo ; un dominio tirosina cinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga diversos residuos de tirosina que pueden ser fosforilados. (Plowman *et al*. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90: 1746-1750). La secuencia del dominio extracelular HER2/neu (ECD) fue descrita por Franklin *et al*. (2004) Cancer Cell. 5(4):317-328, y está a la disposición en el registro del Banco de Datos de Proteínas 1S78 (2004).

El dominio HER2/neu funciona como receptor de factores de crecimiento y muchas veces es expresado por tumores como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de células de vejiga, cáncer de ovario y cáncer de pulmón. El dominio HER2/neu es sobreexpresado en el 25-30% de los cánceres de mama y de ovario humanos, y se asocia con progresión clínica agresiva y mal pronóstico en estos pacientes. (Slamon *et al*. (1987) Science 235: 177-182; Slamon *et al*. (1989) Science 244:707-712). También se ha observado la sobreexpresión del dominio HER2/neu en otros carcinomas como carcinomas de estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. (Véase, por ejemplo, King *et al*. (1985) Science 229:974; McCann *et al*. (1990) Cancer 65:88-92; Yonemura *et al*. (1991) Cancer Research 51: 1034).

Se han desarrollado diversos anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña que se dirigen a HER-1 o HER2/neu, incluida, en particular, una variante humanizada de un anticuerpo monoclonal murino conocido como 4D5 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.) que reconoce un epítopo extracelular (los aminoácidos 529 a 627) en el dominio rico en cisteína-II del dominio HER2/neu, que reside muy cerca de la región transmembrana de la proteína. Estudios han demostrado que en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2/neu, el tratamiento con anticuerpos específicos para HER2/neu en combinación con agentes quimioterápicos (por ejemplo, cisplatino, doxoubicina, taxol) desencadena una mayor respuesta citotóxica que el tratamiento con el agente quimioterápico solo. (Hancock *et al*. (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Arteaga *et al*. (1994) Cancer 54:3758-3765; Pietras *et al*. (1994) Oncogene 9: 1829-1838). Un mecanismo posible mediante el cual los anticuerpos contra HER2/neu podrían potenciar la respuesta a los agentes quimioterapéuticos es a través de la modulación de la expresión de la proteína HER2/neu o interfiriendo en la reparación del ADN. (Stancovski *et al*. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:8691-8695; Bacus *et al*. (1992) Cell Growth & Diff. 3:401-411; Bacus *et al*. (1993) Cancer Res. 53:5251-5261; Klapper *et al*. (1997) Oncogene 14:2099-2109; Klapper *et al*. (2000) Cancer Res. 60:3384-3388; Arteaga *et al*. (2001) J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s. Aunque en algunos casos los anticuerpos anti-HER2/neu, como puede ser HERCEPTIN® proporcionan beneficio terapéutico a los pacientes, la mayor parte de los pacientes con cáncer de mama y otros muestran respuestas que no responde al tratamiento con tales anticuerpos. Estas respuestas reflejan, en parte, diferencias en el grado de la sobreexpresión del dominio HER2/neu en las células cancerosas de los pacientes.

Como consecuencia de contener regiones variables capaces de unirse al dominio Her2/neu y al receptor de células T ("TCR"), la proteína DART tiene la capacidad para unirse a las células que expresen HER2 y con ello unan a tales

células un dominio capaz de unirse al receptor de células T. Con estas células T unidas a este dominio, estas se activan para iniciar una respuesta inmunitaria que produzca la aniquilación de células que expresan HER2.

Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para tales DART se proporcionan más adelante, con las secuencias VL y VH mostradas en texto normal, el ligador VL-VH mostrado en texto subrayado y la secuencia que codifica el motivo de la heterodimerización C-terminal (ID SEC NO: 313: GFNRGEC o ID SEC NO: 314: GVEPKSC) mostrado en negrita e itálica.

Secuencia de aminoácidos TCRVL-HER2VH (ID SEC NO: 315)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GFNRGE***
C

Secuencia de ácido nucleico que codifica TCRVL-HER2VH (ID SEC NO: 316)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc***ggattcaa caggggagag***
tgt

Secuencia de aminoácidos HER2VL-TCRVH (ID SEC NO: 317)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS***GVEPK***
SC

Secuencia de ácido nucleico que codifica HER2VL-TCRVH- (ID SEC NO: 318)

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc***ggagt tgagcccaaa***
tcttgt

En una realización preferida, tales constructos son modificados para que contengan un dominio de ovillo E u ovillo K que facilite la formación de los heterodímeros (es decir, los dímeros TCRVL-HER2VH x HER2VL-TCRVH). Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para tal DART se proporcionan a continuación, con las secuencias

VL y VH mostradas en texto normal, el ligador VL-VH mostrado en texto subrayado y la secuencia que codifica el ligador que contiene Cys para la dimerización (GGCGGG; residuos 2-7 de la ID SEC NO: 267) mostrado en itálica o cursiva. El dominio para la heterodimerización de ovillo E u ovillo K tiene un doble subrayado (la secuencia "ovillo E" preferida es de 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK; ID SEC NO: 299; la secuencia de "ovillo K" preferida es de 4 repeticiones heptaméricas de KVAALKE (ID SEC NO: 300). La secuencia siguiente al dominio ovillo E o el dominio ovillo K no tiene una función adjudicada.

Secuencia de aminoácidos TCRVL-HER2VH-ovillo E (ID SEC NO: 319)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GGCGGG***
EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEKGG GNS

Secuencia de ácido nucleico que codifica TCRVL-HER2VH-ovillo E (ID SEC NO: 320)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct *ccggaggatg tggcggtgga*
gaagtggccg cactggagaa agaggttgct gctttggaga aggaggtcgc tgcacttgaa
aaggaggtcg cagccctgga gaaaggcggc gggaattct

Secuencia de aminoácidos HER2VL-TCRVH-ovillo K (ID SEC NO: 321)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS*GGCGG*
GKVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKEG GGNS

Secuencia de ácido nucleico que codifica HER2VL-TCRVH-K (ID SEC NO: 322)

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc*ggagg atgtggcggt*
*gga*aaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt
aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct

Las moléculas de DART que tienen dominios de unión a Her2 y al receptor de células T (TCR) se sometieron a prueba para determinar su capacidad para mediar en la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de

mama, cáncer de colon y cáncer de vejiga que anteriormente se habían caracterizado como que presentaban bajos niveles de expresión de HER2 (y de este modo no respondían al tratamiento con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®. Las líneas celulares de cáncer de mama sometidas a prueba son ZR75-1 (HER2 2+) (figura 50 A), MCF-7 (HER2 1+) (figura 50B) y MDA-MB468 (negativas para HER2) (figura 50C). Las líneas celulares de cáncer distinto de mama sometidas a prueba son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (figura 50D) y SW780 (línea celular de cáncer de vejiga) (figura 50E). Como se muestra en las figuras 49A-E, tales moléculas de DART fueron sustancialmente más eficaces que HERCEPTIN® para mediar en la citotoxicidad de líneas celulares derivadas de tumor, en términos de las concentraciones necesarias para lograr una citotoxicidad equivalente, y en términos de los niveles máximos de citotoxicidad observada.

6.20 FUSIÓN *IN VITRO* DE DART CON ABD A TRAVÉS DE LOS DOMINIOS DE OVILLO E Y K

Como se explica en lo anterior, las moléculas de DART de la presente invención pueden estar diseñadas para que presenten unión biespecífica al receptor de NKG2D como afinidad para un hapteno, fluoresceína, para que estos puedan servir como adaptadores universales, capaces de coligar el receptor de NKG2D con moléculas que interaccionan con las parejas de unión conjugadas a fluoresceína. Para demostrar además el uso de los ABD, se construyó un DART utilizando las cadenas polipeptídicas:

(1) KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (ID SEC NO: 313) - ovillo E: Este polipéptido fue construido utilizando el dominio VL del anticuerpo anti-KYK 2.0 antes descrito (Kwong, Y *et al*. (2008) "*Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity*", J. Mol. Biol. 384: 1143-1156; y documento PCT/US09/54911) y el dominio VH del AcM anti-fluoresceína antes descrito, 4420.

(2) 4420VL-KYK2VH-GVEP SC (ID SEC NO: 314): Este polipéptido fue construido utilizando el dominio VL del AcM anti-fluoresceína antes descrito, 4420 y el dominio VH del anticuerpo KYK 2.0. "Ovillo E" indica la secuencia de aminoácidos del dominio de ovillo E de 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK; ID SEC NO: 299.

Los polipéptidos KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (ID SEC NO: 313) - ovillo E y 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (ID SEC NO: 314) se cotransfectaron en células CHO para expresar un DART denominado "KYK2 4420 VF ovillo E." La purificación de estas moléculas se muestra en las figuras 51A y 51B. La afinidad de DART KYK2 4420 VF ovillo E fue determinada detectando con Fc NKG2D 012210 la unión de DART al antígeno FITC capturado. Los resultados del experimento demuestran que el DART fue capaz de unirse a ambas moléculas (figura 52).

Además, se realizó una fusión ovillo K - GGGNS (ID SEC NO: 301) - ABD, donde "ovillo K" indica la secuencia de aminoácidos del dominio de ovillo K de 4 repeticiones heptaméricas de KVAALKE (ID SEC NO: 300). La figura 53 proporciona un mapa de restricción del plásmido pPAL7, y representa el constructo del plásmido pPAL7 ovillo K ABD, que expresa la fusión ovillo K-ABD utilizando una etiqueta PROFINITY EXACT™ (Bio-Rad, Hercules, CA) para facilitar la purificación. El vector pPAL7 ovillo K ABD fue transformado en células BL21DE3 de *E. coli*. La expresión de ovillo K ABD etiquetada fue inducida por la adición de IPTG 2 mM durante 4 horas. La expresión de la proteína fue verificada por SDS-PAGE o mediante análisis de inmunotranferencia de tipo Western. En resumen, el sistema de etiqueta de fusión PROFINITY EXACT™ implica mediar en la lisis de células, uniendo las proteínas liberadas a una columna de afinidad de subtilisina proteasa inmovilizada, lavando la columna para eluir las proteínas no unidas, aplicando un tampón de elución que contenga fluoruro con el fin de activar la subtilisina para escindir rápida y precisamente la etiqueta de la proteína de fusión después de la disociación de la secuencia de reconocimiento de escisión, lavar la proteína libre de la etiqueta a partir de la columna después de tal escisión y dializar la proteína eluida en PBS. La figura 54 muestra un análisis de inmunotranferencia de tipo Western de la proteína ovillo K ABD purificada con la resina de purificación PROFINITY EXACT™ (pequeña escala de 10 ml de cultivo).

La proteína ovillo K-AFD obtenida de la resina de purificación PROFINITY EXACT™ además fue purificada utilizando SDS-PAGE (figura 55). El cultivo de 250 del de *E. coli* produjo 6,523 mg de la proteína purificada (Tabla 18).

TABLA 18

Fracciones eluidas	Tampón	Conc. (mg/ml)	Volumen	Proteína total (mg)
1-6	PBS	0,412	6	2,06
7-9	PBS + NaF 100 mM	0,924	1,8	1,663
10-13	PBS + NaF 100 mM	0,800	3,5	6,8
				6,523

El DART KYK2 4420 VF ovillo E y la proteína ovillo K ABD fueron incubadas en PBS durante 30 min a temperatura ambiente para formar una proteína ovillo E - ovillo K ABD DART con propiedades mejoradas. Los resultados del

análisis de ELISA muestran que todos los dominios del complejo pueden unirse a sus respectivos ligandos (figuras 56A-56C). Si se desea, es posible obtener purificación adicional del complejo KYK2 4420 VF E y ovillo K ABD utilizando una columna anti-EK.

Puesto que la formación del complejo depende de los dominios de unión particulares de la proteína DART, es posible utilizar los métodos antes mencionados para generar DART ovillo E - ovillo K ABD con otras especificidades de unión (por ejemplo, por complejaciónde una proteína CD32B (por ejemplo, el anticuerpo 2B6) / CD16A (por ejemplo, el anticuerpo 3G8) VFE DART con una proteína ovillo K ABD).

Por tanto, como ya se mencionó, en una realización de la invención, ambos polipéptidos que comprenden el dominio de unión a antígeno de la proteína DART pueden comprender una secuencia adicional que sirva para impulsar la formación del heterodímero (por ejemplo, ovillo K u ovillo E) y como opción uno de tales polipéptidos puede contener una parte polipeptídica de una proteína de unión al suero capaz de unirse a la proteína del suero (por ejemplo, figura 45). En una realización alternativa, uno, y de preferencia solo uno de los polipéptidos que comprenden el dominio de unión a antígeno de DART puede tener tal secuencia adicional para impulsar la formación del heterodímero (por ejemplo, una secuencia de ovillo K o una secuencia de ovillo E) y el DART puede comprender un complejo con otro (por ejemplo, un tercer) polipéptido que no contenga un sitio de unión a antígeno, pero que contenga un polipéptido que tenga una secuencia complementadora para impulsar la formación del heterodímero (por ejemplo, una secuencia de ovillo K en la que el polipéptido que contiene el dominio de unión a antígeno de la proteína DART contiene una secuencia ovillo E; o una secuencia de ovillo E en la que el polipéptido que contiene el dominio de unión a antígeno de DART contiene una secuencia de ovillo K) y como opción una parte polipeptídica de una proteína de unión al suero capaz de unirse a la proteína del suero. La parte polipeptídica de tal proteína de unión al suero de tal otro (por ejemplo, tercer) polipéptido puede ubicarse de manera N-terminal o C-terminal respecto al polipéptido que tiene tal secuencia complementadora.

Se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin salir de su alcance, como resultará evidente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas que se describen en el presente documento se ofrecen solamente a modo de ejemplo, y la invención ha de limitarse solamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> MacroGenics, Inc. Johnson, Leslie S. Huang, Ling S. Rainey, Godfrey J. A.

<120> Diacuerpos covalentes y sus usos

<130> 1301.000715

<140> PCT/US11/45922
<141> 2011-07-29

<150> US 60/671657
<151> 2005-04-15

<150> US 61/370046
<151> 2010-08-02

<150> US 11/409339
<151> 2006-04-17

<150> PCT/US06/014481
<151> 2006-04-17

<150> US 60/945523
<151> 2007-06-21

<150> US 61/019051
<151> 2008-01-04

<150> US 12/138867
<151> 2008-06-13

<150> PCT/US08/66957
<151> 2008-06-13

<150> US 61/139352

<151> 2008-12-19

<150> US 61/156035
<151> 2009-02-27

<150> US 61/256779
<151> 2009-10-30

<160> 322

<170> Patent In version 3.5

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
1 5 10

<210> 3
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
50 55 60

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
        115                 120                 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 6
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
            20                  25                  30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
        35                  40                  45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    50                  55                  60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65                  70                  75                  80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
                85                  90                  95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
            100                 105                 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
        115                 120                 125

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145                 150                 155                 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            180                 185                 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        195                 200                 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln
    50                  55                  60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 8
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
        115                 120                 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
    210                 215
```

<210> 9
<211> 237
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15
```

```
Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235
```

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1               5
```

<210> 11
<211> 244
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys
```

<210> 12
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15
```

```
Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn
                165                 170                 175

Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
    210                 215                 220


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 13
<211> 241
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln
145                 150                 155                 160

Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp
                165                 170                 175

Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys
            180                 185                 190

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro
        195                 200                 205

Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe
    210                 215                 220

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

Cys
```

<210> 14
<211> 470
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

```
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445


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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 15
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220
```

```
Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 16
<211> 243
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30
```

```
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg
225                 230                 235                 240

Gly Glu Cys
```

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador más C-terminal de cadena IgG-kappa humana

<400> 17

```
Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5                   10
```

<210> 18
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320
```

```
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 19
<211> 485
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
            20                  25                  30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
        35                  40                  45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
    50                  55                  60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
                85                  90                  95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
            100                 105                 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
        115                 120                 125
```

```
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
    130                 135                 140

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                165                 170                 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
            180                 185                 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
        195                 200                 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
    210                 215                 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
                245                 250                 255

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
            260                 265                 270

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
        275                 280                 285

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
    290                 295                 300

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
305                 310                 315                 320

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
                325                 330                 335

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            340                 345                 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        355                 360                 365

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
385                 390                 395                 400

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
                405                 410                 415

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
            420                 425                 430

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
        435                 440                 445

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
    450                 455                 460

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
465                 470                 475                 480

Ser Leu Gly Gly Cys
                485
```

5 <210> 20

<211> 469
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
        115                 120                 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
                245                 250                 255

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
            260                 265                 270

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
    290                 295                 300

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
305                 310                 315                 320

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                325                 330                 335

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
            340                 345                 350

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
        355                 360                 365

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
    370                 375                 380

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
                405                 410                 415

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
            420                 425                 430

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
        435                 440                 445

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
    450                 455                 460

Ser Leu Gly Gly Cys
465
```

<210> 21
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

```
Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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


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

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225                 230                 235                 240

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

Thr 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> 22
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175
```

```
Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                245
```

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
```
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5
```

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 2B6 de CDR1

<400> 24
```
Asn Tyr Trp Ile His
1               5
```

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

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 3H7 de CDR1

<400> 25
```
Asp Ala Trp Met Asp
1               5
```

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 2B6 de CDR2

<400> 26
```
Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 3H7 de CDR2

<400> 27
Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 2B6 de CDR3

<400> 28
Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 3H7 de CDR3

<400> 29
Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 de CDR1

<400> 30
Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 3H7 de CDR1

<400> 31
Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 de CDR2

<400> 32

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 de CDR2

<400> 33
Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 de CDR2

<400> 34
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 3H7 de CDR2

<400> 35
Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 de CDR3

<400> 36
Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 3H7 de CDR3

<400> 37
Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 38
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 2B6

<400> 38
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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met 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 Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 de Hu2B6VL-1

<400> 39
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 humanizado de Hu2B6VL-2

<400> 40

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

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

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 humanizado de Hu2B6VL-3

<400> 41

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

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

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65                  70                  75                  80

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

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

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 43
```
Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1               5
```

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 44
```
Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1               5
```

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 45
```
Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1               5
```

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 46

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 47
Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 48
Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 49
Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG para receptor FcgammaRIIB

<400> 50
Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 51
Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 52
Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 53
Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de unión de IgG de receptor FcgammaRIIB

<400> 54
Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 55
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh321F

<400> 55
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 56
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh318R

<400> 56
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctccaccttg gtccctc 47

<210> 57
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh319F

<400> 57
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt cagctggtgc agtctgg 47

<210> 58

<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh320R

<400> 58
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg 43

<210> 59
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh315R

<400> 59
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctcaagcttg gtcccc 46

<210> 60
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh316F

<400> 60
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt accctgagag agtctggc 48

<210> 61
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh317R

<400> 61
tttgaattcc tagcagcctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc 47

<210> 62
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh339R

<400> 62
ctcaacgcag cctcccagtg agctcac 27

<210> 63
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh340R

<400> 63
aacgcagcct cccagtgagg agacggtgac c 31

<210> 64

<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh366R

<400> 64
tttgaattct atttacccgg agacagg 27

<210> 65
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lhg367F

<400> 65
ctgggaggct gcgcagagcc caaatcttgt gac 33

<210> 66
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh368R

<400> 66
gtcacaagat ttgggctctg cgcagcctcc cag 33

<210> 67
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh369R

<400> 67
tttgaattct aacactctcc cctgttgaag cagcctccca gtgaggagac 50

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de anti-CD16A humanizado Hu3G8VH-1

<400> 68

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
            20                  25                  30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
    50                  55                  60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 69
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de anti-CD16A humanizado de Hu3G8VH-5

<400> 69

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
            20                  25                  30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
    50                  55                  60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 70
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de anti-CD16A humanizado de Hu3G8VH-22

<400> 70

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
            20                  25                  30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
    50                  55                  60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser
        115
```

<210> 71
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado de Hu3G8VL-1

<400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 72
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado de Hu3G8VL-43

<400> 72

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 73
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado de Hu3G8VL-22

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 74
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia de ADN de SEQ ID NO:10

<400> 74
ggaggcggat ccggaggcgg aggc 24

<210> 75
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 75
ttcaacaggg gagagtgt 18

<210> 76
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador más C-terminal de cadena IgG-kappa humana

<400> 76
ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt 30

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 78
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 78
gttgagccca aatcttgt 18

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 354
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 80

caggttaccc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60

acttgttctt tctctgggtt ttcactgagg acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggtct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240

ttcctcaaaa tcgccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 81
<211> 354
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 81
caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 60

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 240

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 82
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82
Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 83
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 83

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 84
<211> 332
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de anti-CD16A humanizado de Hu3G8VL-1

<400> 84
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aa 332

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 2B6 humanizado

<400> 85
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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val 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 Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 363

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de 2B6 humanizado

<400> 86
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatcctt ctgatactta tccaaattac 180

aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtcg tatccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300

gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 humanizado

<400> 87
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera de 2B6 humanizado

<400> 88

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de escisión de trombina

<400> 89
Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

<210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de escisión de Factor Xa

<220>
<221> VARIANT
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa=Glu ó Asp

<400> 90
Ile Xaa Gly Arg
1

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de escisión de enterocinasa

<400> 91
Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de escisión de furina

<220>
<221> VARIANT
<222> (2) .. (3)
<223> Xaa=cualquier aminoácido

<400> 92

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de escisión de furina preferido

<220>
<221> VARIANT
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa=cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANT
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa=Lys ó Arg

<400> 93
Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sitio de reconocimiento de escisión de AcTEV

<400> 94
Gln Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 95
<211> 487
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Precursor poliproteínico de diacuerpo covalente

<400> 95

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
            180                 185                 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220
```

```
Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Asp Val Gln Met Thr Gln
                245                 250                 255

Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn
            260                 265                 270

Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln
        275                 280                 285

Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu
    290                 295                 300

Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
305                 310                 315                 320

Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr
                325                 330                 335

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            340                 345                 350

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr
        355                 360                 365

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

Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly
385                 390                 395                 400

Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
                405                 410                 415

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
            420                 425                 430


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

Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
    450                 455                 460

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465                 470                 475                 480

Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
                485
```

<210> 96
<211> 1464
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN SEQ ID NO:97 (precursor poliproteínico de diacuerpo covalente)

<400> 96

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat 780

cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc 840

aagtatttag cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat 900

gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat 960

ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg gactctatta ctgtcaacag 1020

cattatgaat atccagccac gttcggttct gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga 1080

tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc 1140

cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt 1200

gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg 1260

gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc 1320

tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac 1380

tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact 1440

gtgagctcac tgggaggctg ctag 1464

<210> 97
<211> 511
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Precursor poliproteínico de diacuerpo covalente

<400> 97

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
            180                 185                 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr
                245                 250                 255

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
            260                 265                 270

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

Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser
    290                 295                 300

Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu
305                 310                 315                 320
```

```
Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
                325                 330                 335

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu
            340                 345                 350

Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr
        355                 360                 365

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

Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile
385                 390                 395                 400

Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe
                405                 410                 415

Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
        435                 440                 445

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

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp
465                 470                 475                 480

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
                485                 490                 495

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
            500                 505                 510
```

<210> 98
<211> 1536
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN SEQ ID NO:99 (precursor poliproteínico de diacuerpo covalente)

<400> 98

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc     60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat    240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac    300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag    360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg    420
```

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gcccctgtga agcagaccct gaacttcgac 780

ctgctgaagc tggccggaga cgtggagagc aaccccggcc ccgatgtcca gatgacccag 840

tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt 900

gagagcatta gcaagtattt agcctggtat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt 960

cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatct ggaattccat cgaggttcag tggcagtgga 1020

tctggtacag atttcactct caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat 1080

tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcggtt ctgggaccaa gctggagatc 1140

aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag gttaccctga aagagtctgg ccctgggata 1200

ttgcagccct cccagaccct cagtctgact tgttctttct ctgggttttc actgaggact 1260

tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcaggga agggtctaga gtggctggca 1320

cacatttggt gggatgatga caagcgctat aatccagccc tgaagagccg actgacaatc 1380

tccaaggata cctccagcaa ccaggtattc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat 1440

actgccacat actactgtgc tcaaataaac cccgcctggt ttgcttactg gggccaaggg 1500

actctggtca ctgtgagctc actgggaggc tgctag 1536

<210> 99
<211> 239
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80
```

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 100
<211> 720
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 100

```
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc     60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca    120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg    180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct    240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga    300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaga    360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct    420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag    480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg    540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc    600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt    660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag    720
```

<210> 101
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys
                245
```

<210> 102
<211> 741
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 102

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca 720

gttgagccca aatcttgtta g 741

<210> 103
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 103
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

<210> 104
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 104
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 105
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 105

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 106
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 106
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

<210> 107
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 107
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR1

<400> 108
Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR1

<400> 109
Thr Ser Gly Val Gly Val Gly
1 5

<210> 110
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR2

<400> 110
Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR2

<400> 111
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 112
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 113
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 113
His Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 114
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 115
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 115
His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 116
<211> 16

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 116
His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 117
Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 118
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 118
His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 119
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 119
Leu Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 120
His Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 121
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 121
Leu Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 122
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 122
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ile Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 123
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 123
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 124
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 124
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 125
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 125
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 126
<211> 29
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 126
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 127
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 127
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 128
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 128
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 129
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 129
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 130
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 130

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 131
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 131
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 132
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 132
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 133
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 133
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 134
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 134
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 135

<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 135
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 136
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 136
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 137
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 137
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 138
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 138
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 139
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 139
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 140
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 140
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 141
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 141
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 142
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 142
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ser Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 143
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 143
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 144
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 144
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 145
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 145
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 146
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 146
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 147
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 147
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 148
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 148
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 149
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 149
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 150
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 150
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 151
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 151
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 152
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 152
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 153
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 153
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 154
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 154
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 155
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 155
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 156
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 156
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 157
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 157
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 158
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 158
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 159
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 159
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 160
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 160
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 161
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 161

```
Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1               5                   10                  15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20                  25
```

<210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 162
```
Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1               5
```

<210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 163
```
Ile Asn Pro Ala Trp Phe Asp Tyr
1               5
```

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 164
```
Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr
1               5
```

<210> 165
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 165
```
Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr
1               5
```

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR4

<400> 166
```
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1               5                   10
```

<210> 167

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VH derivadas de 3G8 VH * FR4

<400> 167
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* FR1

<400> 168
Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

<210> 169
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* FR1

<400> 169
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

<210> 170
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 170
Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 171
Arg Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 172
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 172
Lys Ser Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 173
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 173
Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 174
Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 175
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 175
Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 176
Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 177
Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 178
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 178
Arg Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 179
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 179
Lys Ser Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 180
Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 181
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 181
Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 182
Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 183
Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 184
Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 185
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 185
Arg Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 186
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 186
Lys Ser Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 187
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 187
Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 188
Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 189
<211> 11
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 189
Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 190
Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 191
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 191
Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 192
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 192
Arg Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 193
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 193
Lys Ser Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 194

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 195
Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 196
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 196
Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 197
Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 198
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 198
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 199
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 199
Arg Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 200
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 200
Lys Ser Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 201
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 202
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 202
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 203
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 203
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 204
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 204
Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 205
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* FR2

<400> 205
Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 206
Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 207
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 207
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 208
Trp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 209
Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

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

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 210
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

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

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 211
Asp Ala Ser Asn Leu Ala Thr
1 5

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

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 212
Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

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

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 213
Ser Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 214
Ser Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 215
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 215
Thr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 216
Thr Thr Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 217
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* FR3

<400> 217
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 218
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* FR3

<400> 218
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 219
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 220
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 221
Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 222

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 222
Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 223
Gln Gln Ser Asn Glu Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 224
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* FR4

<400> 224
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 225
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencias de VL derivadas de 3G8 VL* FR4

<400> 225
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 226
<211> 714
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 226

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360

gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 420

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 480

ggacaaggcc ttgaatggat tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat 540

caaatgttca aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600

cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agctatgggc 660

tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg agcccaaatc ttgt 714

<210> 227
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 227

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro
145                 150                 155                 160

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

Thr His Tyr Asn Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
            180                 185                 190

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln
    210                 215                 220

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230                 235
```

<210> 228
<211> 732
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 228

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc     60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg    120
```

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 420

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 480

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 540

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 600

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 660

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctcattcaac 720

aggggagagt gt 732

<210> 229
<211> 244
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 229

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

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

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg
145 150 155 160

```
Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp
                165                 170                 175

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp
        195                 200                 205

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
    210                 215                 220

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

Arg Gly Glu Cys
```

<210> 230
<211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 230

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt     60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca    120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct    240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct    300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag    360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct    420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt    480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag    540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc    600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa    660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt gt                       702
```

<210> 231
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 231

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
        115                 120                 125

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


Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230
```

<210> 232
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 232

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgtt caacagggga 720

gagtgt 726

<210> 233
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 233

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
115 120 125

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

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145                 150                 155                 160

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly
225                 230                 235                 240

Glu Cys
```

<210> 234
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 234

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt     60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca    120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct    240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct    300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag    360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct    420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt    480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag    540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc    600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa    660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc                              696
```

<210> 235
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 235

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 236
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 236

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc     60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg    120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac    180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc    240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720
```

<210> 237
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 237

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
```

```
        115                 120                 125

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

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145                 150                 155                 160

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 238
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh628F

<400> 238
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

<210> 239
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh629R

<400> 239
tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

<210> 240
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh630R

<400> 240
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

<210> 241
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh631F

<400> 241
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

<210> 242
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh640R

<400> 242
tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

<210> 243
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh644R

<400> 243
tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

<210> 244
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh646R

<400> 244
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

<210> 245
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh647F

<400> 245
caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

<210> 246
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh648R

<400> 246
tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

<210> 247
<211> 1044
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 247

gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc 60

atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag cctggtatct acagaaacct 120

gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct 240

gaagattttg gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct 300

gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa 360

gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca gtctgacttg ttctttctct 420

gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag 480

ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc 600

agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac tgggaggctg cggcggaggg 720

agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 780

tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 840

cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag 900

gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac 960

gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca 1020

aagagcttca acaggggaga gtgt 1044

<210> 248
<211> 348
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 248

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

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
145                 150                 155                 160

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
            180                 185                 190

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
            260                 265                 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
        275                 280                 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
305                 310                 315                 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                325                 330                 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345
```

<210> 249
<211> 1734
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 249
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggca 780

ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 840

ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 900

ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 960

tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 1020

aaggtggaca agagagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1080

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 1140

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1200

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1260

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1320

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1380

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1440

accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1500

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1560

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1620

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1680

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1734

<210> 250
<211> 578
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 250

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175
```

```
Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
            180                 185                 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
```

<210> 251
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 251

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720
```

<210> 252
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 252

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 253
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 253

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120
```

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 254
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 254

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

```
Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 255
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 255

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag    540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc    600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa    660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc                               696
```

<210> 256
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 256

```
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 Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Glu 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 Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 257
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 257

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240
```

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc 720

<210> 258
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 258

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

<210> 259
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC

<400> 259
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 260
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC

<400> 260
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 Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

```
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Glu 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 Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 261
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh321F

<400> 261
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 262
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh386R

<400> 262
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45

<210> 263
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh784F

<400> 263
ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

<210> 264
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh785R

<400> 264
cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38

<210> 265
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh786R

<400> 265
tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

<210> 266
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Lgh787F

<400> 266
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

<210> 267
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 267
Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 268
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 268
Leu Glu Ile Lys
1

<210> 269
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 269
Thr Val Ser Ser
1

<210> 270
<211> 343
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 270
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 Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Glu 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 Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

```
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala
225                 230                 235                 240

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
                245                 250                 255

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
            260                 265                 270

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
        275                 280                 285

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
    290                 295                 300

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
305                 310                 315                 320

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
                325                 330                 335

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340
```

<210> 271
<211> 1032
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 271

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180
```

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg gagggagccg aactgtggct 720

gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct 780

gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 840

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 900

acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 960

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1020

ggagagtgtt ag 1032

<210> 272
<211> 574
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 272

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
            260                 265                 270

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            340                 345                 350

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
    370                 375                 380

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

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

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

```
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
        435                 440                 445

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 273
<211> 1722
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 273

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc    420

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc    480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt    600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcct gggaggctgc    720
```

ggcggaggga gcgcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 780

agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 840

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 900

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 960

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020

agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1080

ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1140

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1260

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1320

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1380

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1440

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1500

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1560

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1620

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1680

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1722

<210> 274
<211> 335
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 274

```
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 Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Glu 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 Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95
```

```
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

<210> 275
<211> 1005
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 275

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180
```

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac catcggtctt catcttcccg 720

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 780

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 840

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 900

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 960

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 1005

<210> 276
<211> 566
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

<400> 276

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp 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 Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

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

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
225                 230                 235                 240

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            260                 265                 270

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        275                 280                 285

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
    290                 295                 300

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
305                 310                 315                 320

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                325                 330                 335

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            340                 345                 350

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        355                 360                 365

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    370                 375                 380

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
385                 390                 395                 400

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                405                 410                 415

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            420                 425                 430
```

```
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        435                 440                 445

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    450                 455                 460

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
465                 470                 475                 480

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                485                 490                 495

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            500                 505                 510

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        515                 520                 525

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    530                 535                 540

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
545                 550                 555                 560

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565
```

<210> 277
<211> 1698
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1

<400> 277

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc    420

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc    480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt    600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcgc ctccaccaag    720
```

ggcccatcgg tcttcccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 780

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 840

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 900

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 960

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 1020

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 1080

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 1140

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 1200

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1260

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1320

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1380

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1440

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1500

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1560

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1620

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1680

tccctgtctc cgggtaaa 1698

<210> 278
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 278
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 279
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 279
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
1 5 10

<210> 280
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 280

Leu Glu Gly Glu Glu Gly
1 5

<210> 281
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 281
Leu Glu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5

<210> 282
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 282
Leu Glu Ile Lys
1

<210> 283
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 283
Leu Gly Glu Glu Gly
1 5

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 284
Leu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5

<210> 285
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 285
Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 286
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 286
Leu Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 287
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 287
Leu Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 288
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 288
Leu Lys Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 289
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 289
Leu Lys Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 290
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 290
Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
1 5

<210> 291
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 291
Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 292
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 292
Thr Val Ser Ser
1

<210> 293
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 293
Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 294
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 294
Val Glu Pro Lys Ser Cys Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5 10

<210> 295
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 295
Val Gln Val His Tyr Arg Met
1 5

<210> 296
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 296
Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 297
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 297
Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5

<210> 298
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 298
Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys
1 5

<210> 299
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador de ovillo E

<400> 299
Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 300
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador de ovillo K

<400> 300
Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 301
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 301
Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 302
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de YA2B6

<400> 302

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

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

<210> 303
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de YA2B6 h

<400> 303

```
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 Asn Tyr
            20                  25                  30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met 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 Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 304
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio de unión a albúmina

<400> 304

```
Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1               5                   10                  15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
            20                  25                  30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
        35                  40                  45
```

<210> 305
<211> 279
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-ovilloK-GGGNS

<400> 305

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

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

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190
```

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

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

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
            260                 265                 270

Lys Glu Gly Gly Gly Asn Ser
        275
```

<210> 306
<211> 837
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-ovilloK-GGGNS

<400> 306

```
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc     60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc    240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac    300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag    360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc    420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct    480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat    540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg    600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat    660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc    720

ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag    780

aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct       837
```

<210> 307
<211> 318
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-ovilloE-GGGNS-ABD

<400> 307

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

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

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
                245                 250                 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn Ser
            260                 265                 270

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
        275                 280                 285

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

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
305                 310                 315
```

<210> 308
<211> 954
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-ovilloE-GGGNS-ABD

<400> 308

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga 360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa 720

gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag 780

gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc 840

aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca 900

aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct 954

<210> 309
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 309
Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 310
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 310
Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser
1 5

<210> 311
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 311

```
Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
1               5                  10                  15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
            20                  25                  30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
        35                  40                  45

Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
    50                  55                  60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
65                  70                  75                  80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu
                85                  90                  95

Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
            100                 105                 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
        115                 120                 125

Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
    130                 135                 140

Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
145                 150                 155                 160

Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
                165                 170                 175

Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg
            180                 185                 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met
        195                 200                 205

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
    210                 215                 220
```

```
Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg
225                 230                 235                 240

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

Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile
            260                 265                 270

Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly
        275                 280                 285

Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln
    290                 295                 300

Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile
305                 310                 315                 320

Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
                325                 330                 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
            340                 345                 350

Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
        355                 360                 365

Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
    370                 375                 380
```

<210> 312
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 312

```
Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser
1               5                   10                  15

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe
            20                  25                  30

Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp
        35                  40                  45

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp
    50                  55                  60

Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys
65                  70                  75                  80

Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu
                85                  90                  95

Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val
        115                 120                 125
```

```
Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe
    130                 135                 140

Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln
145                 150                 155                 160

Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Leu Pro Pro Met Val Asn Val Ile
                165                 170                 175

Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser
            180                 185                 190

Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val
        195                 200                 205

Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly
    210                 215                 220

Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu
225                 230                 235                 240

Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr
                245                 250                 255

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


Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
        275                 280                 285

Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
    290                 295                 300

Pro
305
```

<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 313
```
Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5
```

<210> 314
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 314
```
Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1               5
```

<210> 315
<211> 241
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH

<400> 315

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
        115                 120                 125

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

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
                165                 170                 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
            180                 185                 190

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

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 316
<211> 723
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH

<400> 316

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg 120

aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg 180

ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa 240

gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg 300

accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag 360

tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc 420

ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa 480

tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac 540

aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg 600

acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct 660

atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggattcaa caggggagag 720

tgt 723

<210> 317
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH

<400> 317

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

```
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
                165                 170                 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
    210                 215                 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys
225                 230                 235                 240

Ser Cys
```

<210> 318
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH

<400> 318

```
gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc     60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca    120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat    180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct    240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg    300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc    420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa    540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc    600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac    660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagt tgagcccaaa    720

tcttgt                                                               726
```

<210> 319
<211> 273

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH-ovilloE

<400> 319

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
        115                 120                 125

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

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
                165                 170                 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
            180                 185                 190

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

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn
            260                 265                 270

Ser
```

<210> 320
<211> 819
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH-ovilloE

<400> 320

```
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
1               5                  10                  15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr
            20                  25                  30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
    50                  55                  60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys
65                  70                  75                  80

Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
            100                 105                 110

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys
        115                 120                 125

Thr Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr
    130                 135                 140

Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly
145                 150                 155                 160

Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr
        195                 200                 205
```

```
Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly
    210                 215                 220

Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala
225                 230                 235                 240

Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr
                245                 250                 255

Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly
            260                 265                 270

Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly
        275                 280                 285

Thr Thr Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala
    290                 295                 300

Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly
305                 310                 315                 320

Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys
                325                 330                 335

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys
            340                 345                 350

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys
        355                 360                 365

Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr
385                 390                 395                 400

Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys
                405                 410                 415

Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala
            420                 425                 430

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Cys Thr
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys
    450                 455                 460

Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala
465                 470                 475                 480

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr
                485                 490                 495

Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala
            500                 505                 510

Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly
        515                 520                 525
```

```
Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly
    530                 535                 540

Cys Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
545                 550                 555                 560

Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala
                565                 570                 575

Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala
            580                 585                 590

Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala
        595                 600                 605

Gly Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr
    610                 615                 620

Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly
625                 630                 635                 640

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala
                645                 650                 655

Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly
            660                 665                 670

Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly
        675                 680                 685

Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly
    690                 695                 700

Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala
705                 710                 715                 720

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly
                725                 730                 735

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys
            740                 745                 750

Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Cys
        755                 760                 765

Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly
    770                 775                 780

Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala
785                 790                 795                 800

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr
                805                 810                 815

Thr Cys Thr
```

<210> 321
<211> 274
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH-ovilloK

<400> 321

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
                165                 170                 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
    210                 215                 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
                245                 250                 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Gly Gly Gly
            260                 265                 270

Asn Ser
```

<210> 322
<211> 822
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH-ovilloK

<400> 322

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt 720

ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780

aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct 822

REIVINDICACIONES

1. Complejo de diacuerpo que puede unirse con albúmina sérica, en el que dicho complejo de diacuerpo comprende tres cadenas polipeptídicas que comprenden, cada una, un extremo N-terminal y un extremo C-terminal, en el que:

(A) dichas cadenas polipeptídicas primera y segunda se unen de manera covalente entre sí mediante un enlace disulfuro, y comprenden cada una, en el sentido de N-terminal a C-terminal, un dominio variable de cadena ligera unido a un dominio variable de cadena pesada, en el que:

(1) dicho dominio variable de cadena ligera de dicha primera cadena polipeptídica se asocia con dicho dominio variable de cadena pesada de dicha segunda cadena para formar un sitio de unión específico para un primer epítopo; y

(2) dicho dominio variable de cadena ligera de dicha segunda cadena polipeptídica se asocia con dicho dominio variable de cadena pesada de dicha primera cadena para formar un sitio de unión específico para un segundo epítopo;

(B) dicha primera cadena polipeptídica comprende una parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero, estando situada dicha parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero de manera C-terminal respecto a dicho dominio variable de cadena pesada de dicha primera cadena polipeptídica, y siendo un ovillo E o un ovillo K, en el que dicho ovillo E son 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 299, y dicho ovillo K son 4 repeticiones heptaméricas de KVAALKE que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO:300; y

(C) dicha tercera cadena polipeptídica comprende una parte polipeptídica de una proteína capaz de unirse a dicha albúmina sérica, y una parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero que es:

(1) un ovillo E que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 299 si dicha primera cadena polipeptídica comprende un ovillo K que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 300, o

(2) un ovillo K que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 300 si dicha primera cadena polipeptídica comprende un ovillo E que comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 299;

en el que dicha parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero de dichas cadenas polipeptídicas primera y tercera se complejan juntas para formar de ese modo dicho complejo de diacuerpo, y dicho complejo de diacuerpo es capaz de unirse simultáneamente a dicho primer epítopo, a dicho segundo epítopo y a dicha albúmina sérica.

2. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 1, en el que dicha parte polipeptídica de dicha proteína capaz de unirse a dicha albúmina sérica está ubicada de manera N-terminal respecto a dicha parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero.

3. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 1, en el que dicha parte polipeptídica de dicha proteína capaz de unirse a dicha albúmina sérica está ubicada de manera C-terminal respecto a dicha parte polipeptídica que dirige la formación de heterodímero.

4. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 1, en el que dicha proteína capaz de unirse a dicha albúmina sérica es proteína G estreptocócica y dicha parte polipeptídica de la misma es un dominio de unión a albúmina (ABD) de dicha proteína G estreptocócica.

5. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 4, en el que dicho dominio de unión a albúmina (ABD) de dicha proteína G estreptocócica es el dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de proteína G de la cepa G148 de estreptococos.

6. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho complejo de diacuerpo presenta una semivida en suero *in vivo* mayor de 2 horas.

7. Complejo de diacuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que uno de dicho primer epítopo o dicho segundo epítopo es un epítopo de un receptor del grupo de linfocitos citolíticos naturales 2D (NKG2D), un epítopo de un receptor de células T (TCR) o un epítopo de un hapteno.

8. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 7, en el que el otro de dicho primer epítopo o dicho segundo

epítopo es un epítopo de un antígeno asociado a tumor.

9. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 8, en el que dicho antígeno asociado a tumor es un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovario, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer cervicouterino, un antígeno de carcinoma de páncreas, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer de testículo, un antígeno de cáncer de tipo glioblastoma, un antígeno asociado con un tumor maligno de células B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma de no Hodgkin o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

10. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 9, en el que dicho antígeno asociado a tumor es A33; ADAM-9; ALCAM; B1; BAGE; beta-catenina; CA125; carboxipeptidasa M; CD5; CD19; CD20; CD22; CD23; CD25; CD27; CD28; CD32B; CD36; CD40; CD45; CD46; CD56; CD79a; CD79b; CD103; CD154; CDK4; CEA; CTLA4; citoqueratina 8; EGF-R; un receptor de efrina; ErbB1; ErbB3; ErbB4; GAGE-1; GAGE-2; GD2; GD3; GM2; gp100; HER-2/neu; E6 de papilomavirus humano; E7 de papilomavirus humano; integrina alfa-V-beta-6; JAM-3; KID3; KID31; KSA (17-1A); LUCA-2; MAGE-1; MAGE-3; MART; MUC-1; MUM-1; N-acetilglucosaminiltransferasa; oncostatina M (subunidad beta del receptor de oncostatina); pl5; PIP A; PSA; PSMA; RAAG10; ROR1; SART; sTn; TES7; el receptor de TNF-α; el receptor de TNF-β; el receptor de TNF-γ; el receptor de transferrina o el receptor de VEGF.

11. Complejo de diacuerpo según la reivindicación 10, en el que dicho antígeno asociado a tumor es HER-2/neu o CD32B.

12. Composición farmacéutica que comprende el complejo de diacuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, y un portador farmacéuticamente aceptable.

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de cáncer.

14. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, en el que dicho uso es en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer cervicouterino, carcinoma de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de testículo, cáncer de tipo glioblastoma, un tumor maligno de células B, mieloma múltiple, linfoma de no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica.

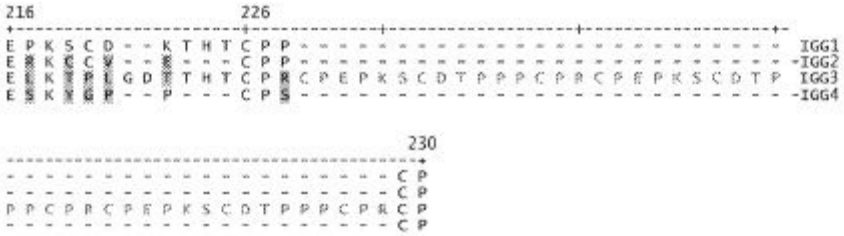


FIG. 1A

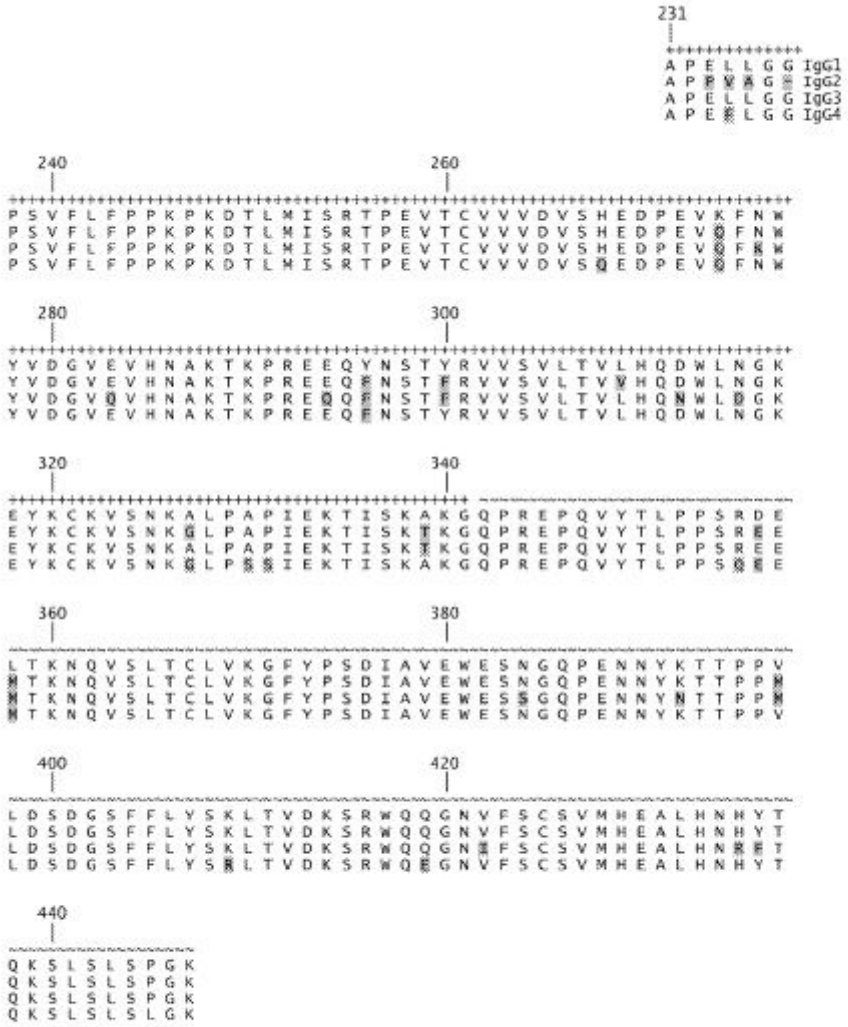

231
A P E L L G G IgG1
A P P V A G P IgG2
A P E L L G G IgG3
A P E P L G G IgG4
240
260
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W
280
300
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K
Y V D G V Q V H N A K T K P R E Q Q F N S T F R V V S V L T V L H Q N W L D G K
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
320
340
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E
360
380
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
400
420
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E A L H N R F T
L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
440
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S P G K
Q K S L S L S L G K

FIG. 1B

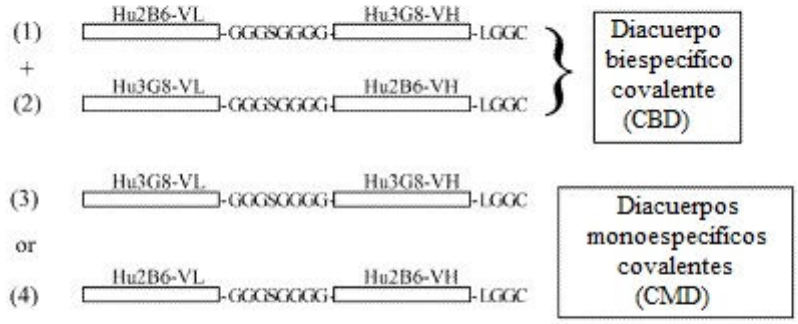

(1)
Hu2B6-VL
GGGSGGGG
Hu3G8-VH
LGGC
+
(2)
Hu3G8-VL
GGGSGGGG
Hu2B6-VH
LGGC
Diacuerpo biespecifico covalente (CBD)
(3)
Hu3G8-VL
GGGSGGGG
Hu3G8-VH
LGGC
or
(4)
Hu2B6-VL
GGGSGGGG
Hu2B6-VH
LGGC
Diacuerpos monoespecificos covalentes (CMD)

FIG. 2

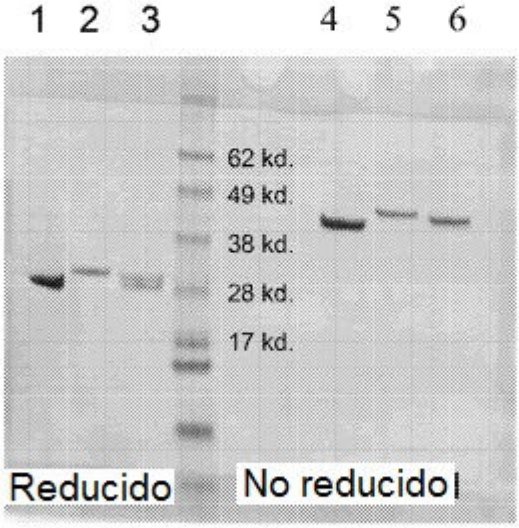


FIG. 3

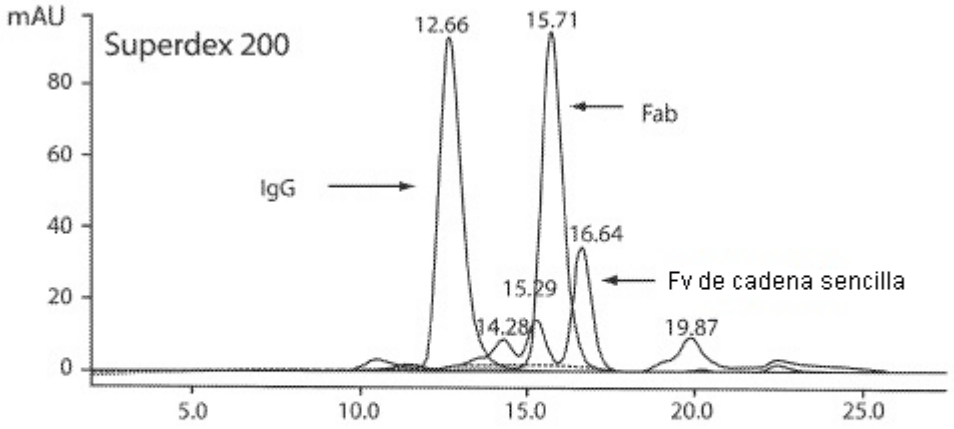

mAU
Superdex 200
12.66
15.71
Fab
IgG
16.64
15.29
Fv de cadena sencilla
14.28
19.87
80
60
40
20
0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0

FIG. 4A

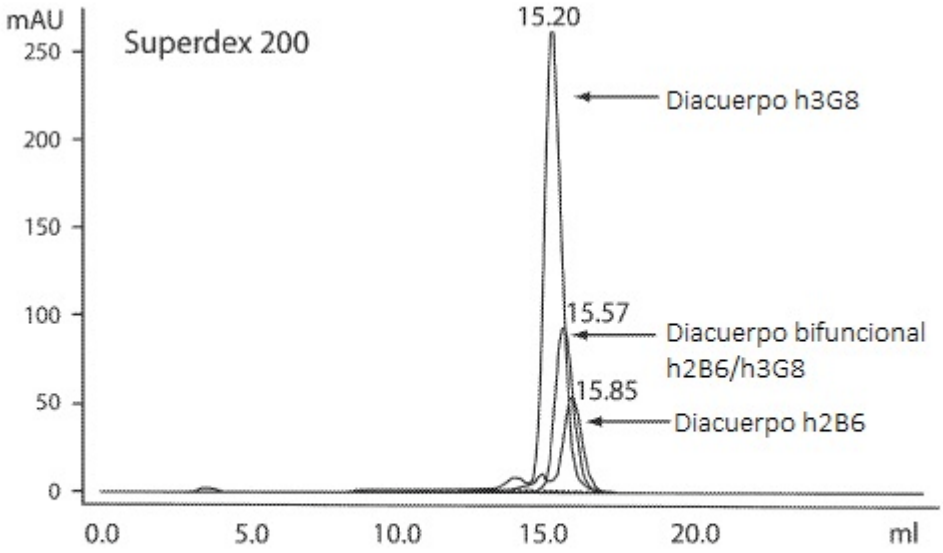

mAU
Superdex 200
15.20
Diacuerpo h3G8
15.57
Diacuerpo bifuncional
h2B6/h3G8
15.85
Diacuerpo h2B6
250
200
150
100
50
0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
ml

FIG. 4B

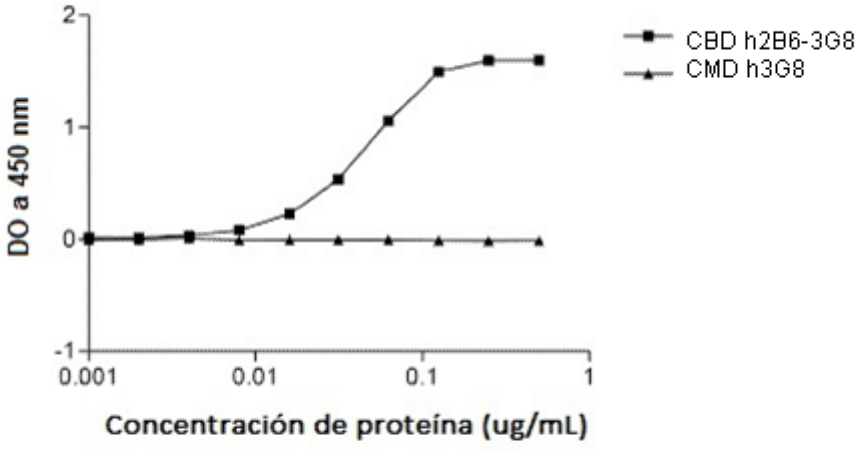

2
1
0
-1
DO a 450 nm
0.001
0.01
0.1
1
Concentración de proteína (ug/mL)
CBD h2B6-3G8
CMD h3G8

FIG. 5

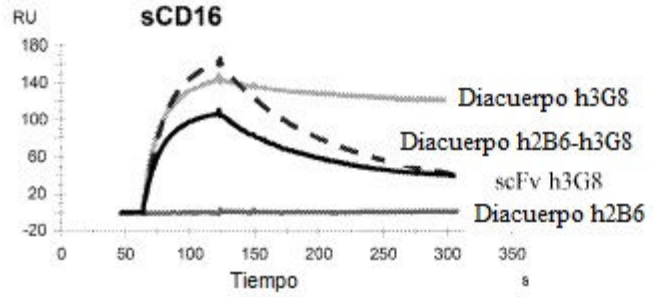


FIG. 6A

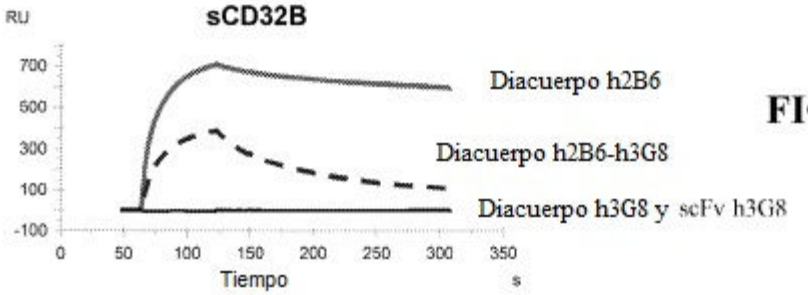


FIG. 6B

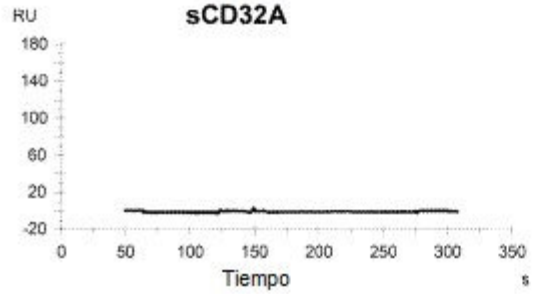


FIG. 6C

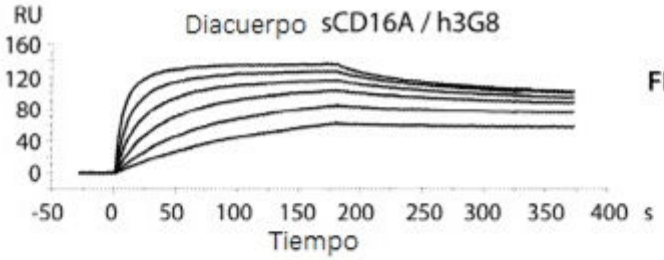


FIG. 7A

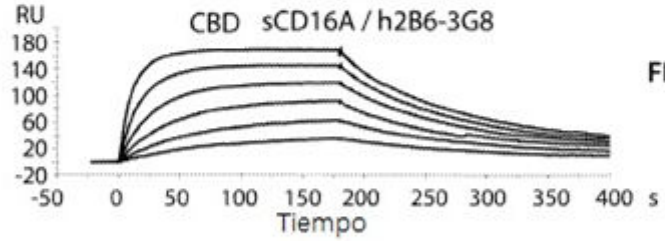


FIG. 7B

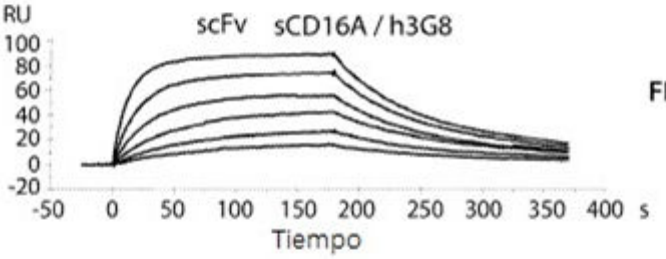


FIG. 7C

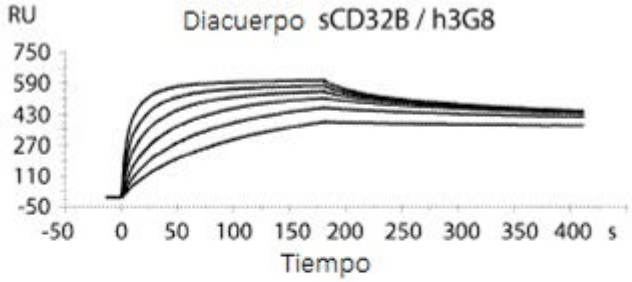


FIG. 7D

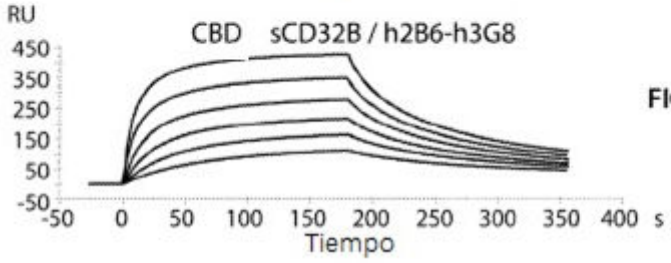


FIG. 7E

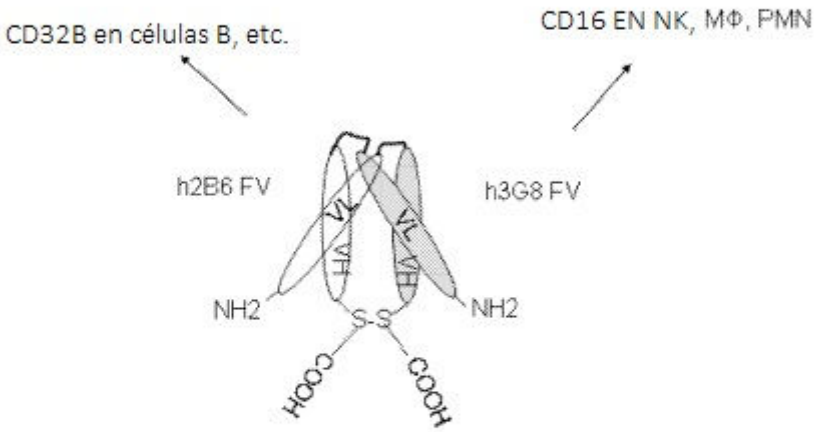

CD32B en células B, etc.
CD16 EN NK, MΦ, PMN
h2B6 FV
h3G8 FV
VL
VH
VL
VH
NH2
S-S
NH2
HOOC
COOH

FIG. 8

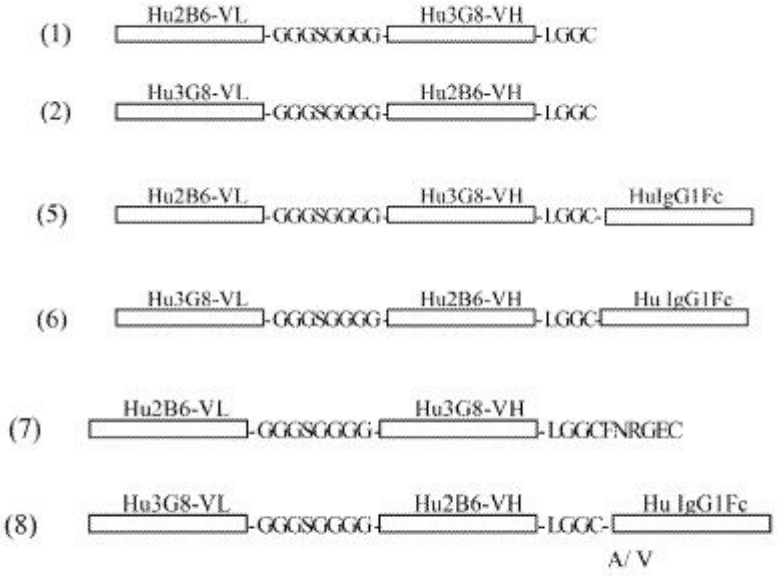

(1)
Hu2B6-VL
GGGSGGGG
Hu3G8-VH
LGGC
(2)
Hu3G8-VL
GGGSGGGG
Hu2B6-VH
LGGC
(5)
Hu2B6-VL
GGGSGGGG
Hu3G8-VH
LGGC
HuIgG1Fc
(6)
Hu3G8-VL
GGGSGGGG
Hu2B6-VH
LGGC
Hu IgG1Fc
(7)
Hu2B6-VL
GGGSGGGG
Hu3G8-VH
LGGCPNRGEC
(8)
Hu3G8-VL
GGGSGGGG
Hu2B6-VH
LGGC
Hu IgG1Fc
A/ V

FIG. 9

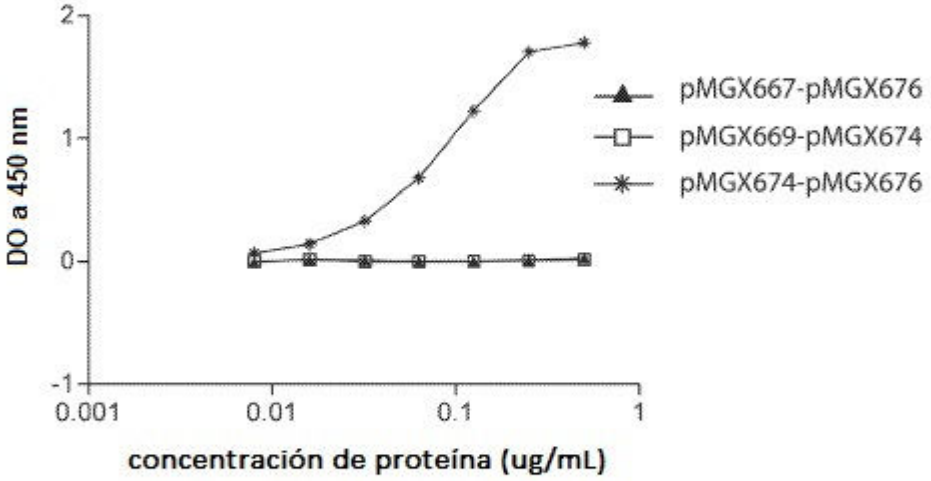

2
1
0
-1
DO a 450 nm
0.001
0.01
0.1
1
concentración de proteína (ug/mL)
pMGX667-pMGX676
pMGX669-pMGX674
pMGX674-pMGX676

FIG. 10

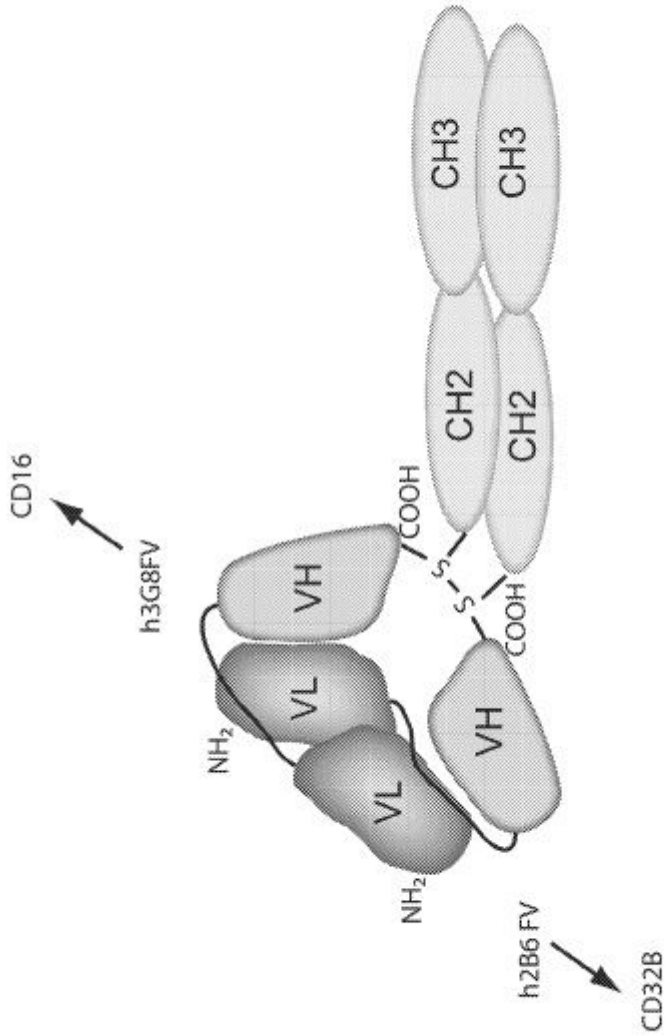

CD16
h3G8FV
VH
VL
NH2
COOH
S
S
CH2
CH2
CH3
CH3
COOH
VH
VL
NH2
h2B6 FV
CD32B

FIG. 11

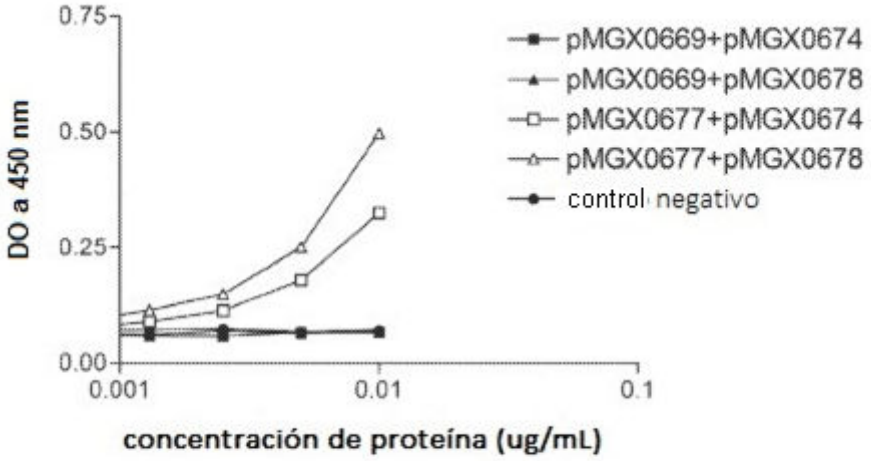

0.75
0.50
0.25
0.00
DO a 450 nm
0.001
0.01
0.1
concentración de proteína (ug/mL)
pMGX0669+pMGX0674
pMGX0669+pMGX0678
pMGX0677+pMGX0674
pMGX0677+pMGX0678
control negativo

FIG. 12

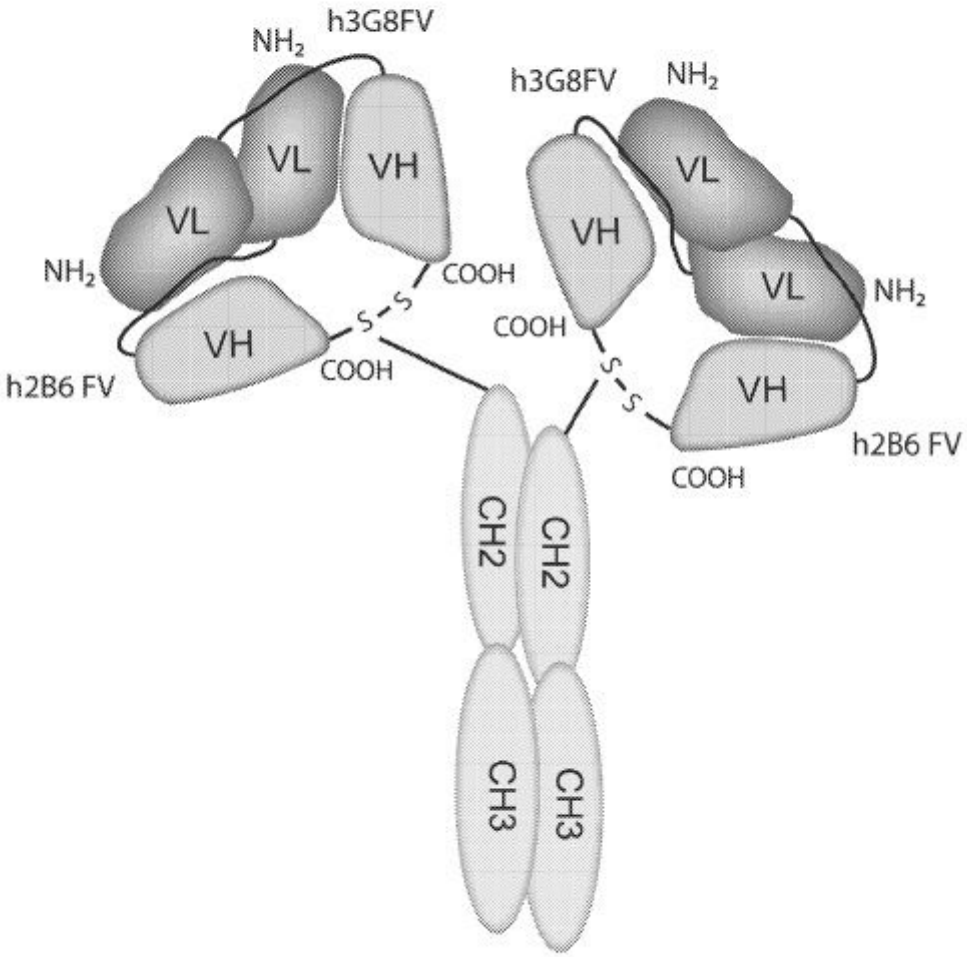

h3G8FV
NH2
VL
VH
VL
NH2
COOH
S-S
VH
COOH
h2B6 FV
h3G8FV
NH2
VL
VH
VL
NH2
COOH
S-S
VH
h2B6 FV
COOH
CH2
CH2
CH3
CH3

FIG. 13

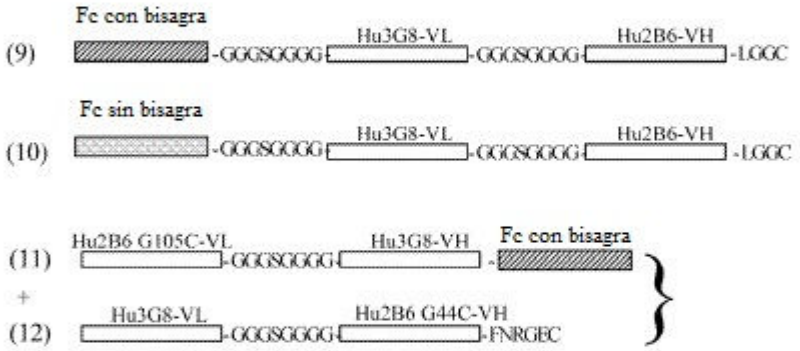

Fc con bisagra
(9)
Hu3G8-VL
Hu2B6-VH
-GGGSGGGG-
-GGGSGGGG-
-LGGC
Fc sin bisagra
(10)
Hu3G8-VL
Hu2B6-VH
-GGGSGGGG-
-GGGSGGGG-
-LGGC
Hu2B6 G105C-VL
Hu3G8-VH
Fc con bisagra
(11)
-GGGSGGGG-
+
Hu3G8-VL
Hu2B6 G44C-VH
(12)
-GGGSGGGG-
-FNRGEC

FIG. 14

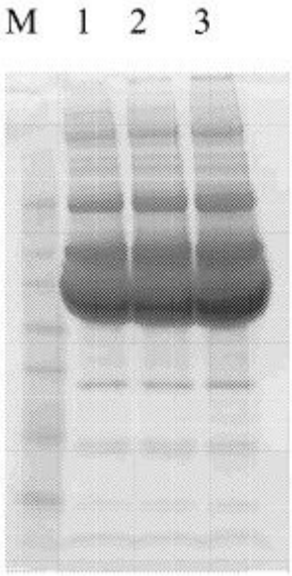


FIG. 15A

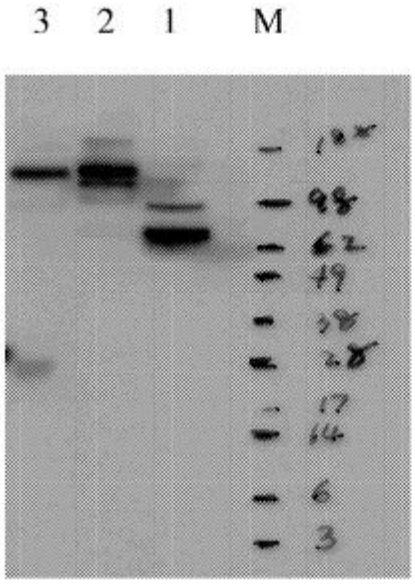


FIG. 15B

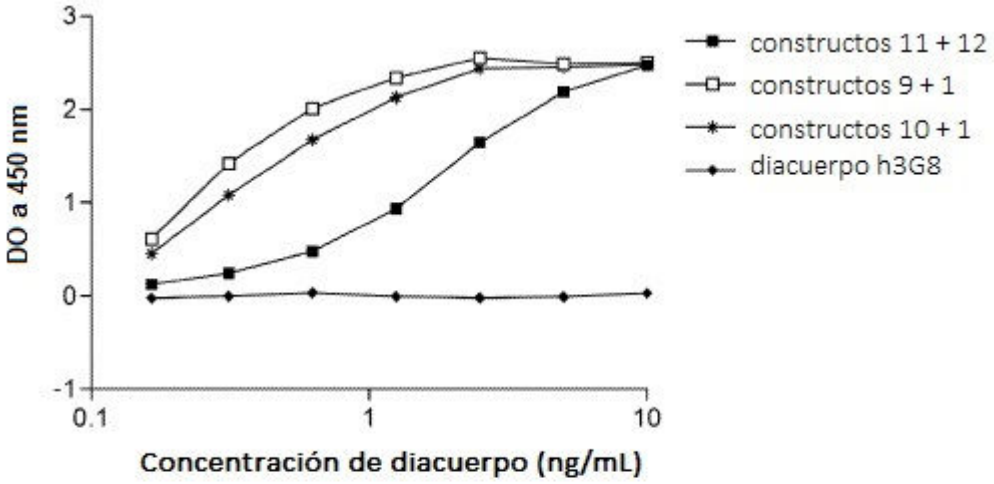

3
2
1
0
-1
DO a 450 nm
0.1
1
10
Concentración de diacuerpo (ng/mL)
constructos 11 + 12
constructos 9 + 1
constructos 10 + 1
diacuerpo h3G8

FIG. 16

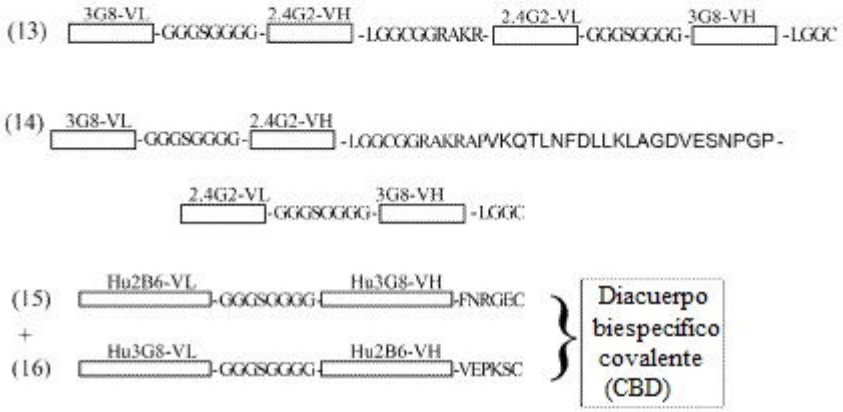

(13) 3G8-VL -GGGSGGGG- 2.4G2-VH -LGGCGGRAKR- 2.4G2-VL -GGGSGGGG- 3G8-VH -LGGC
(14) 3G8-VL -GGGSGGGG- 2.4G2-VH -LGGCGGRAKRAIVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP-
2.4G2-VL -GGGSGGGG- 3G8-VH -LGGC
(15) Hu2B6-VL -GGGSGGGG Hu3G8-VH -FNRGEC
+
(16) Hu3G8-VL -GGGSGGGG Hu2B6-VH -VEPKSC
Diacuerpo biespecífico covalente (CBD)

FIG. 17

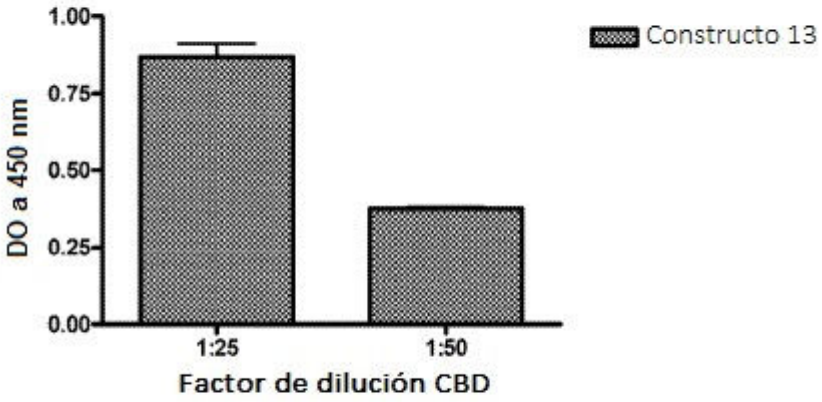

1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
DO a 450 nm
1:25
1:50
Factor de dilución CBD
Constructo 13

FIG. 18

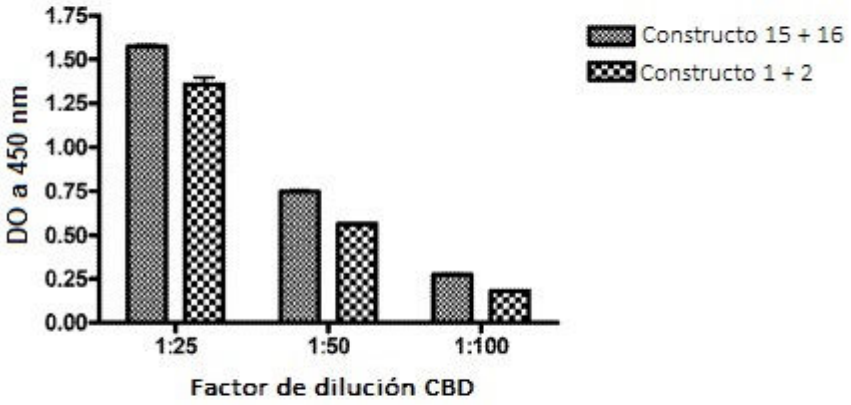

1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
DO a 450 nm
1:25
1:50
1:100
Factor de dilución CBD
Constructo 15 + 16
Constructo 1 + 2

FIG. 19

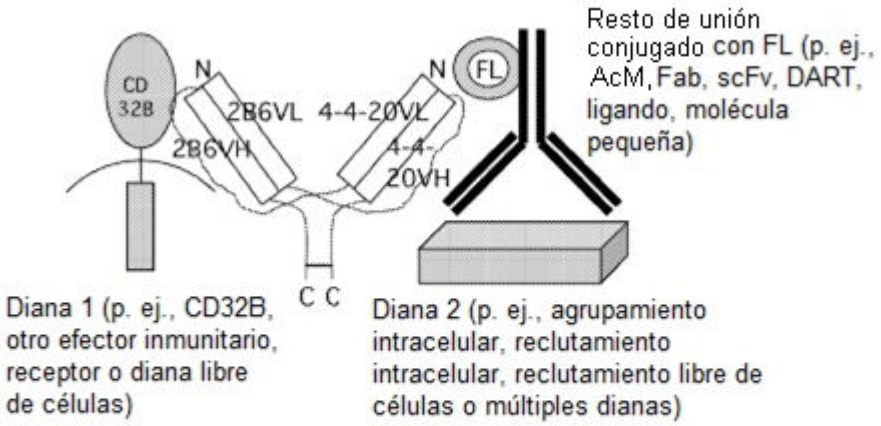

CD 32B
N
2B6VL
2B6VH
4-4-20VL
4-4-20VH
N
FL
Resto de unión conjugado con FL (p. ej., AcM, Fab, scFv, DART, ligando, molécula pequeña)
C C
Diana 1 (p. ej., CD32B, otro efector inmunitario, receptor o diana libre de células)
Diana 2 (p. ej., agrupamiento intracelular, reclutamiento intracelular, reclutamiento libre de células o múltiples dianas)

FIG. 20

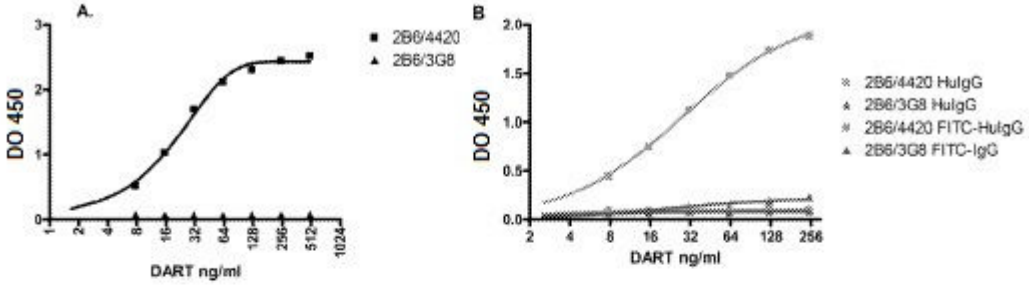


FIG. 21

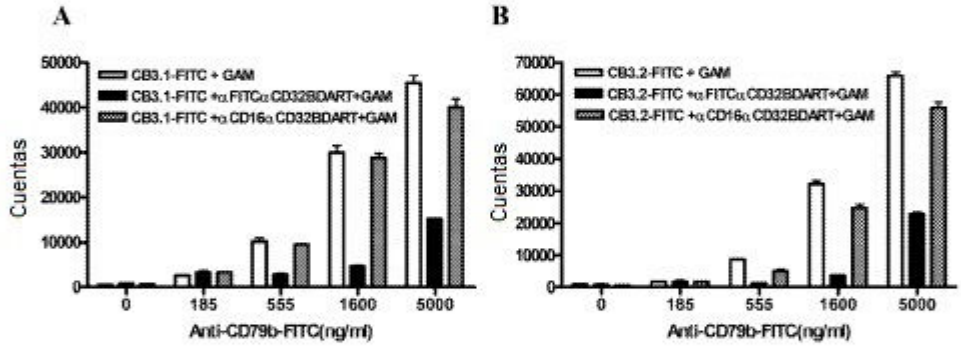


FIG. 22

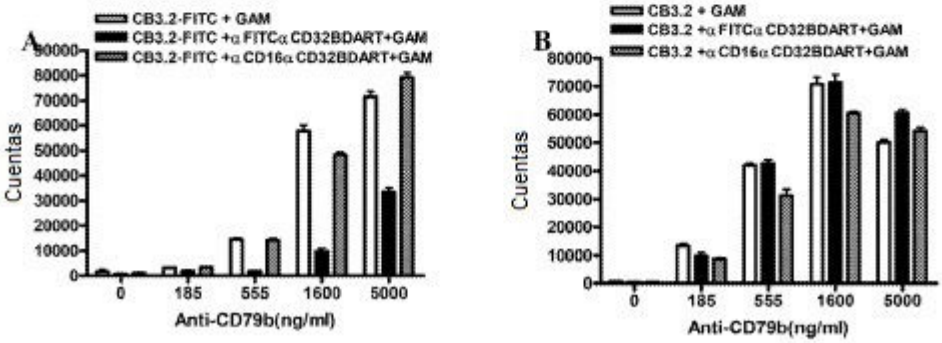


FIG. 23

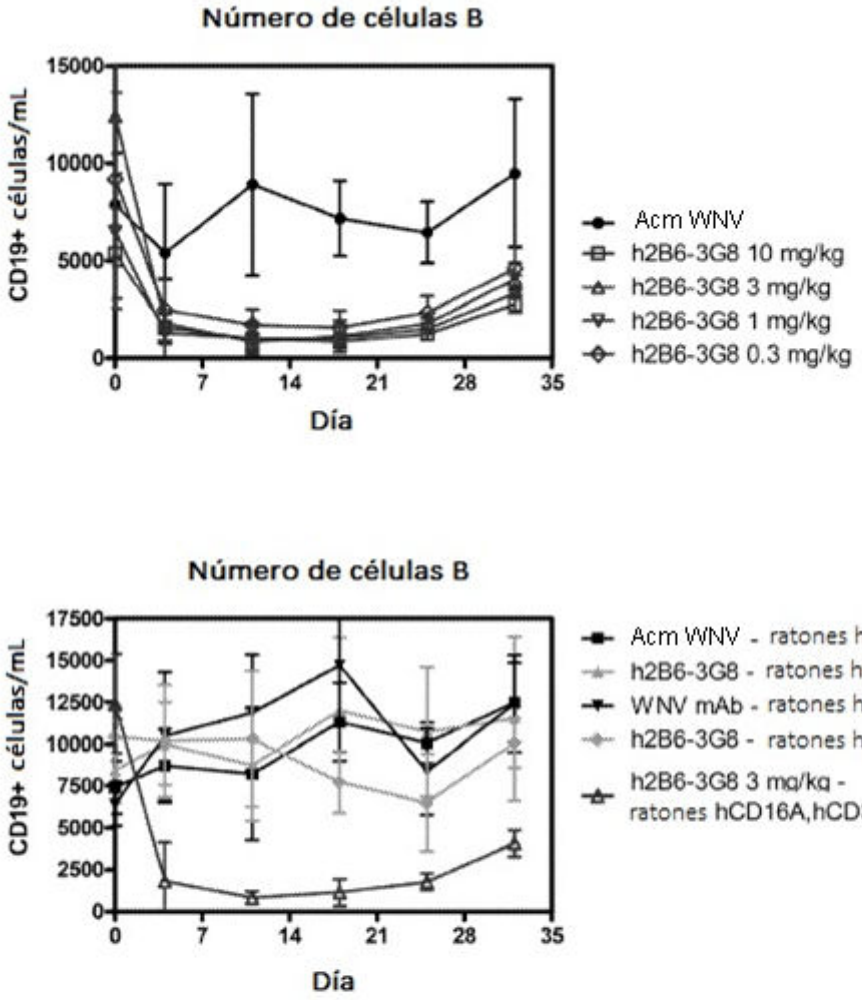

Número de células B
CD19+ células/mL
15000
10000
5000
0
0
7
14
21
28
35
Día
Acm WNV
h2B6-3G8 10 mg/kg
h2B6-3G8 3 mg/kg
h2B6-3G8 1 mg/kg
h2B6-3G8 0.3 mg/kg
Número de células B
CD19+ células/mL
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
0
7
14
21
28
35
Día
Acm WNV - ratones hCD16A
h2B6-3G8 - ratones hCD16A
WNV mAb - ratones hCD32B
h2B6-3G8 - ratones hCD32B
h2B6-3G8 3 mg/kg - ratones hCD16A,hCD32B

FIG. 24

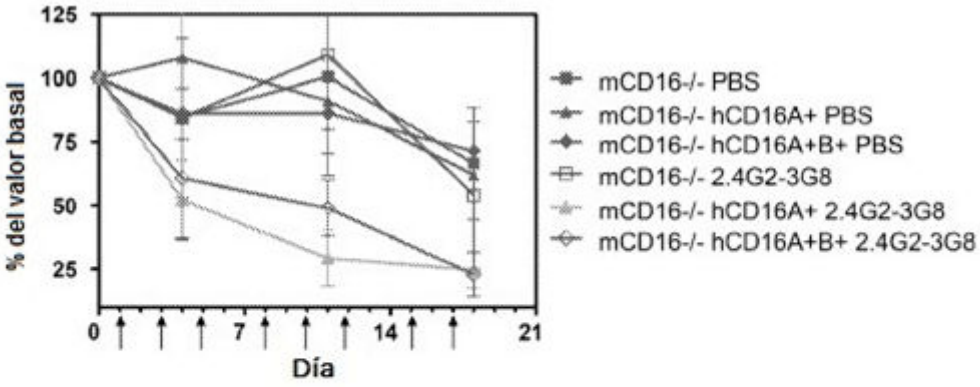

125
100
75
50
25
% del valor basal
0
7
14
21
Día
mCD16-/- PBS
mCD16-/- hCD16A+ PBS
mCD16-/- hCD16A+B+ PBS
mCD16-/- 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+ 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+B+ 2.4G2-3G8

FIG. 25

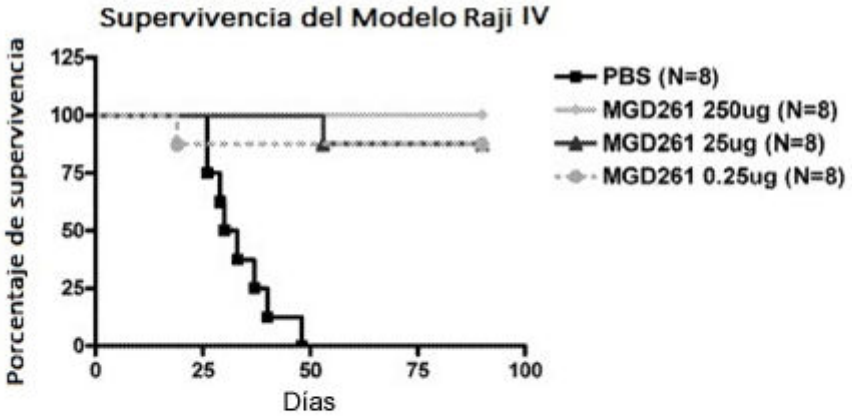

Supervivencia del Modelo Raji IV
Porcentaje de supervivencia
125
100
75
50
25
0
0
25
50
75
100
Días
PBS (N=8)
MGD261 250ug (N=8)
MGD261 25ug (N=8)
MGD261 0.25ug (N=8)

FIG. 26

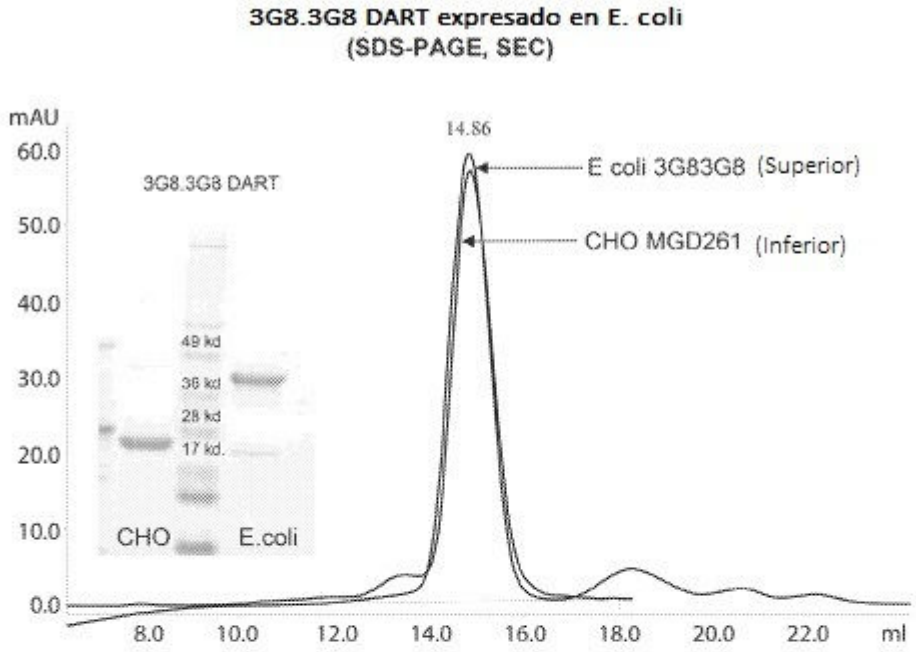

3G8.3G8 DART expresado en E. coli
(SDS-PAGE, SEC)
mAU
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
14.86
E coli 3G83G8 (Superior)
CHO MGD261 (Inferior)
3G8.3G8 DART
49 kd
38 kd
28 kd
17 kd.
CHO
E.coli
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
ml

FIG. 27

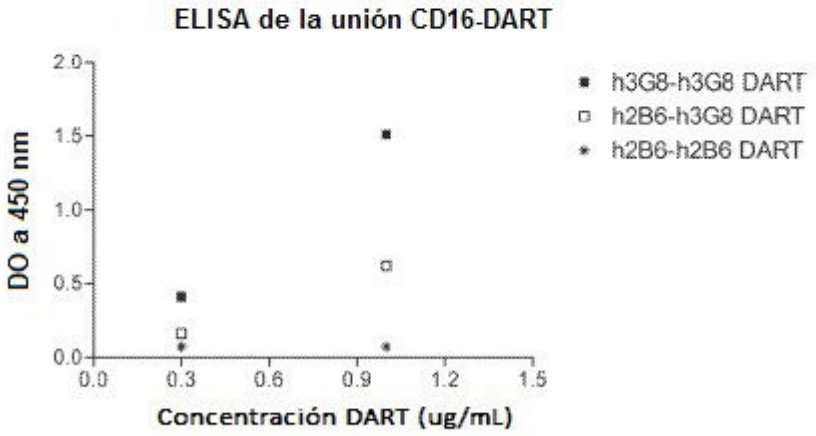

ELISA de la unión CD16-DART
DO a 450 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
0.3
0.6
0.9
1.2
1.5
Concentración DART (ug/mL)
h3G8-h3G8 DART
h2B6-h3G8 DART
h2B6-h2B6 DART

FIG. 28

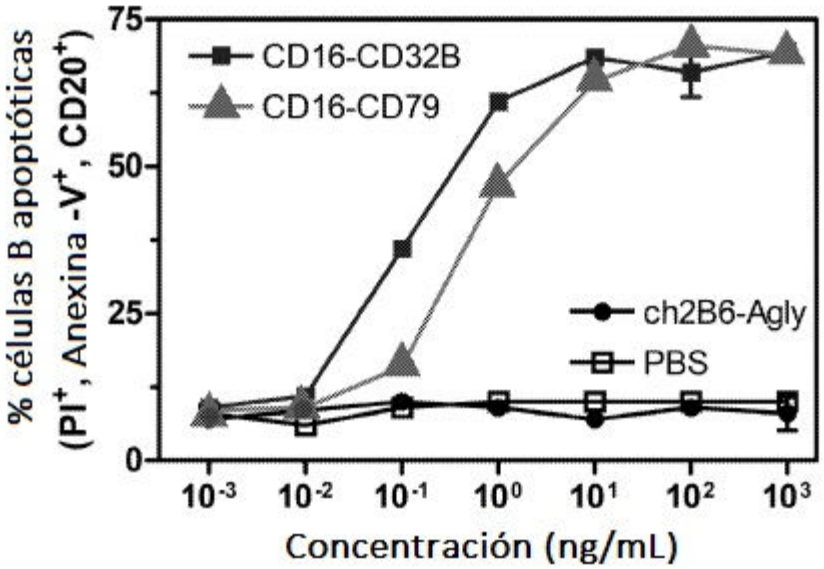

% células B apoptóticas
(PI+, Anexina -V+, CD20+)
75
50
25
0
CD16-CD32B
CD16-CD79
ch2B6-Agly
PBS
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
Concentración (ng/mL)

FIG. 29

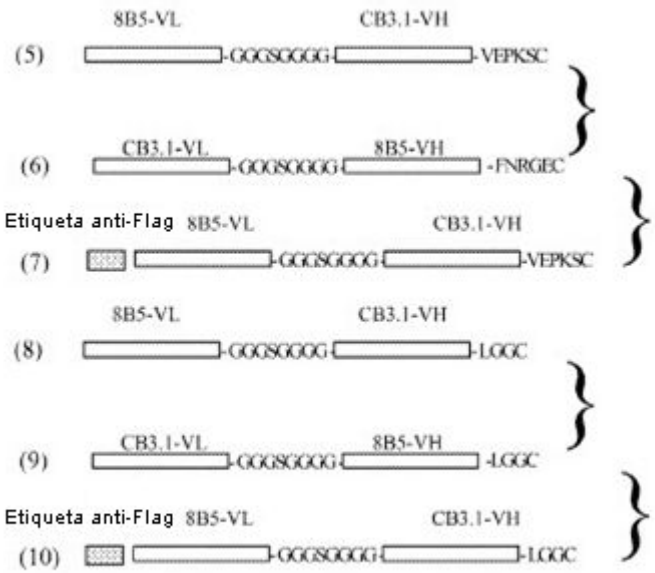

8B5-VL
CB3.1-VH
(5)
-GGGSGGGG-
-VEPKSC
CB3.1-VL
8B5-VH
(6)
-GGGSGGGG-
-FNRGEC
Etiqueta anti-Flag
8B5-VL
CB3.1-VH
(7)
-GGGSGGGG-
-VEPKSC
8B5-VL
CB3.1-VH
(8)
-GGGSGGGG-
-LGGC
CB3.1-VL
8B5-VH
(9)
-GGGSGGGG-
-LGGC
Etiqueta anti-Flag
8B5-VL
CB3.1-VH
(10)
-GGGSGGGG-
-LGGC

FIG. 30

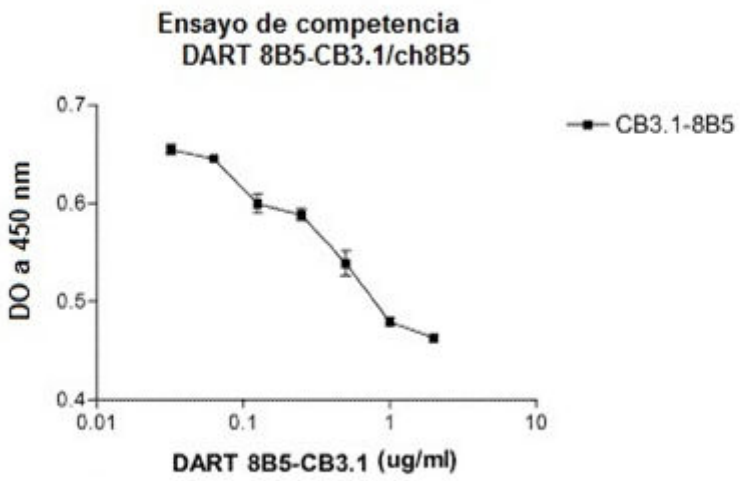

Ensayo de competencia
DART 8B5-CB3.1/ch8B5
CB3.1-8B5
DO a 450 nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.01
0.1
1
10
DART 8B5-CB3.1 (ug/ml)

FIG. 31

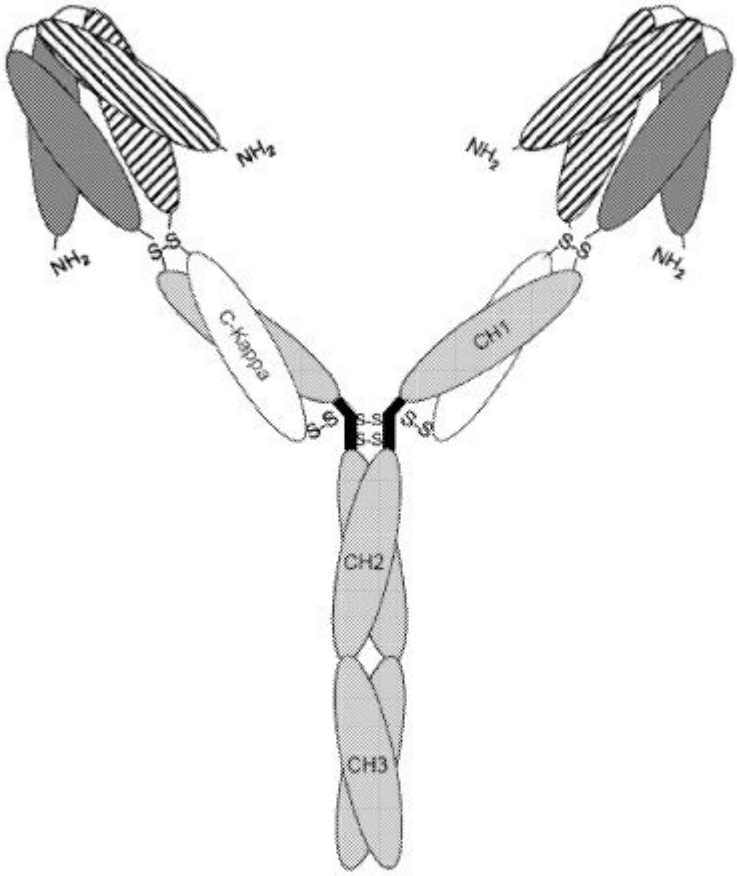
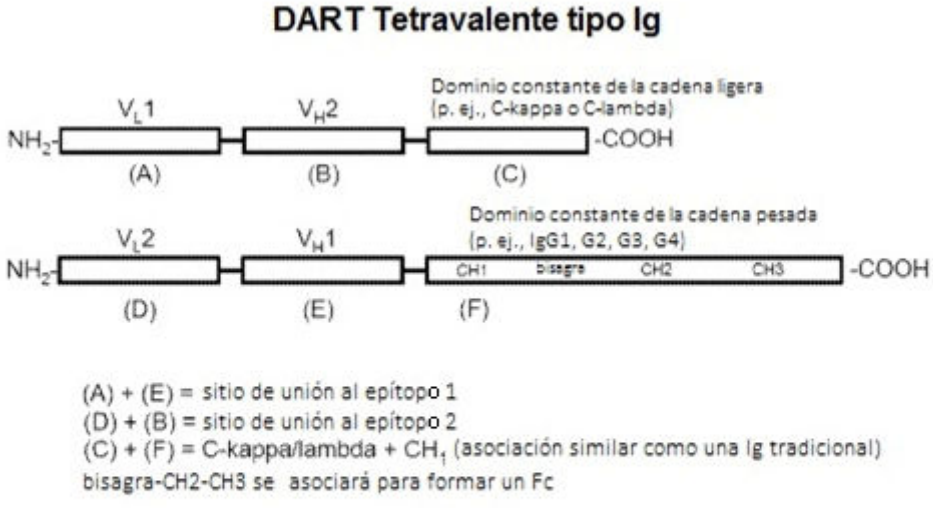


FIG. 32



(A) + (E) = sitio de unión al epítopo 1
(D) + (B) = sitio de unión al epítopo 2
(C) + (F) = C-kappa/lambda + CH_1 (asociación similar como una Ig tradicional)
bisagra-CH2-CH3 se asociará para formar un Fc

FIG. 33

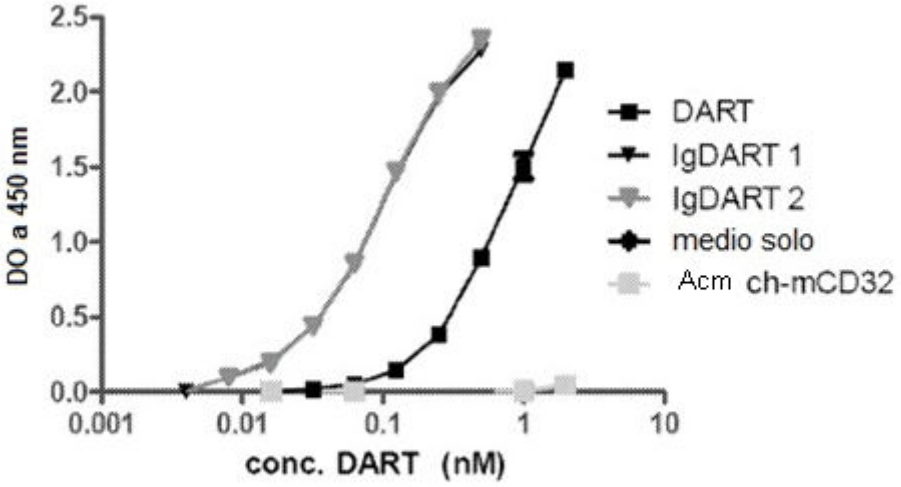


FIG. 34

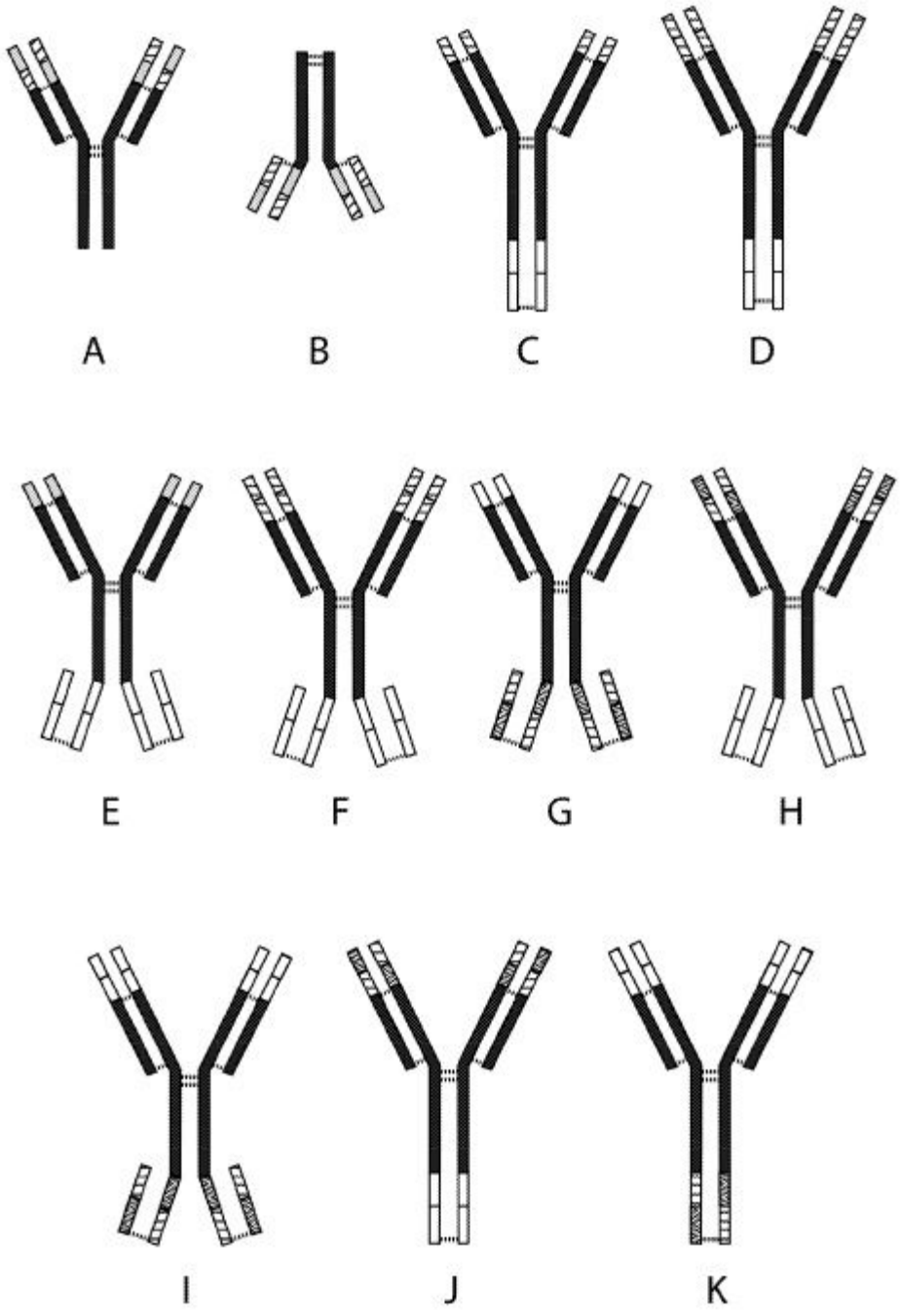


FIG. 35

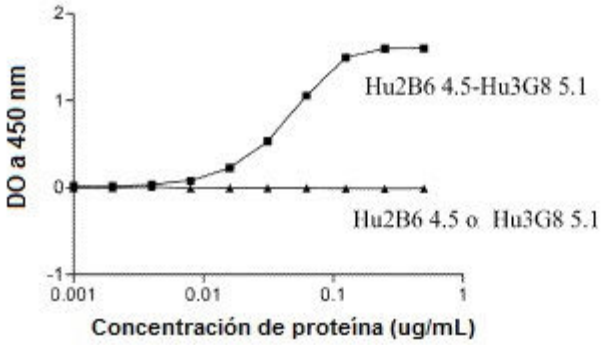

DO a 450 nm
2
1
0
-1
0.001
0.01
0.1
1
Concentración de proteína (ug/mL)
Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1
Hu2B6 4.5 o Hu3G8 5.1

FIG. 36

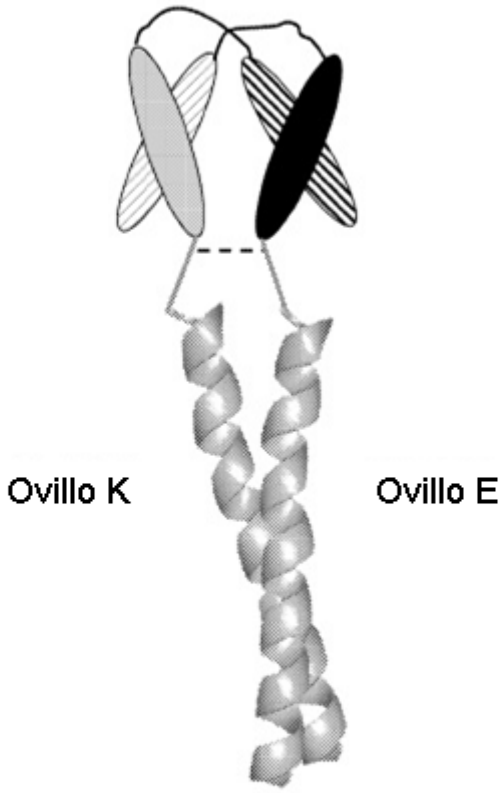


FIG. 37

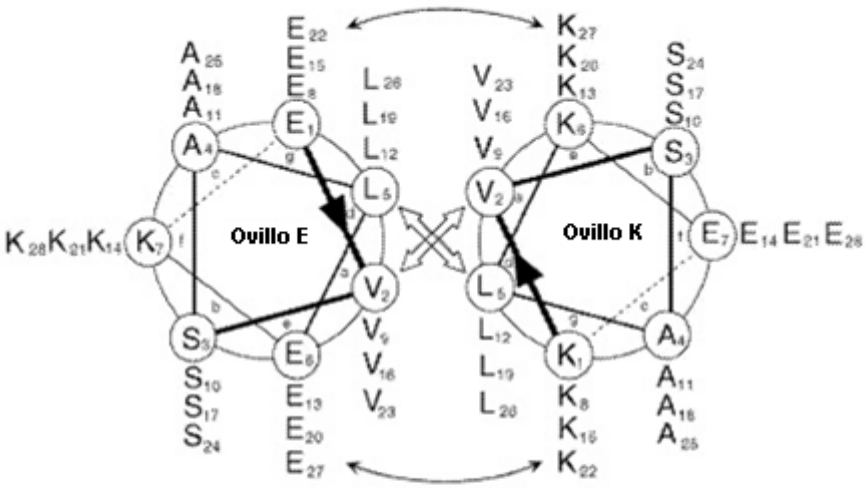


FIG. 38

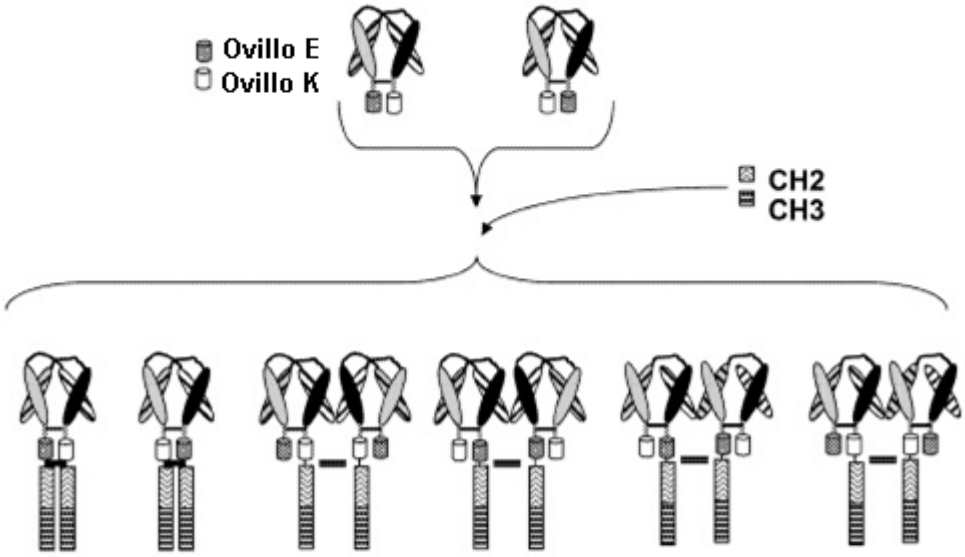


Figura 39

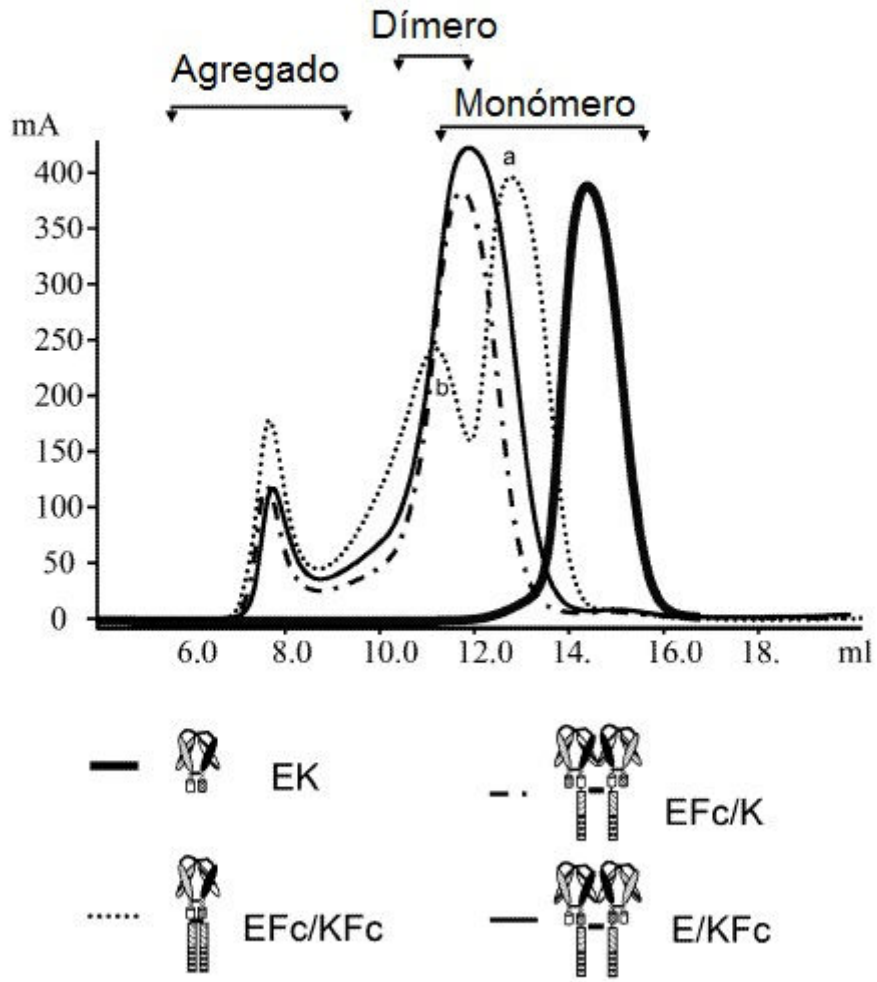

Dímero
Agregado
Monómero
mA
400
350
300
250
200
150
100
50
0
a
b
6.0
8.0
10.0
12.0
14.
16.0
18.
ml
EK
EFc/K
EFc/KFc
E/KFc

Figura 40

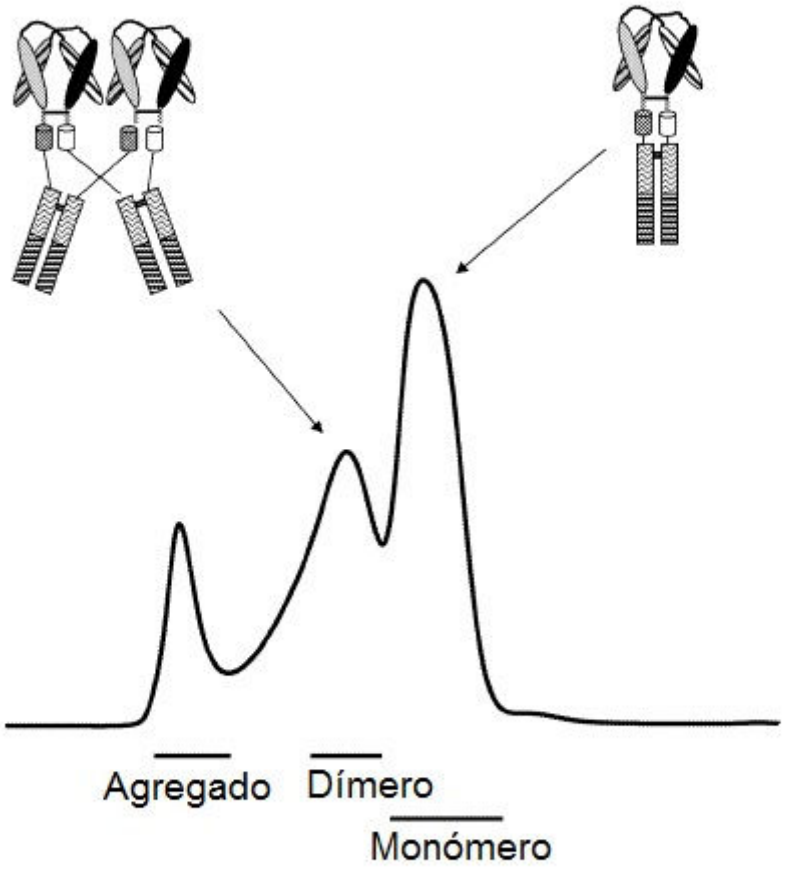


Figura 41

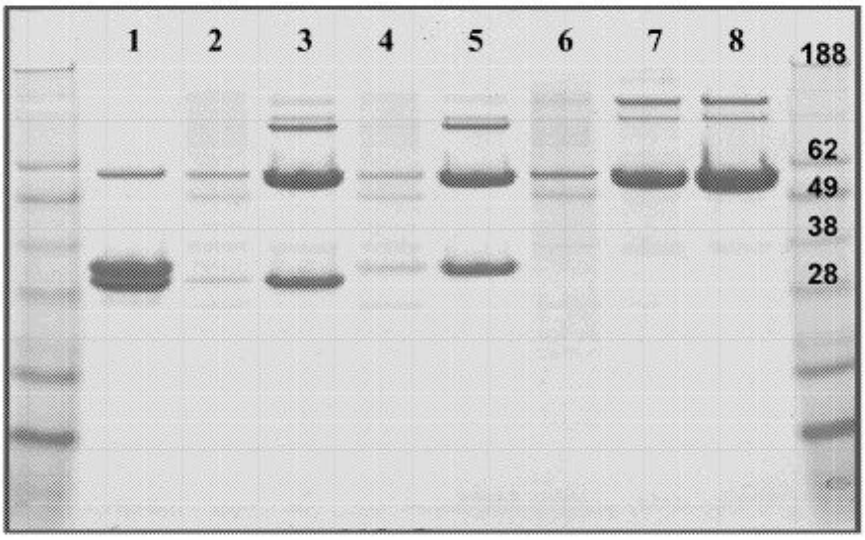


Figura 42

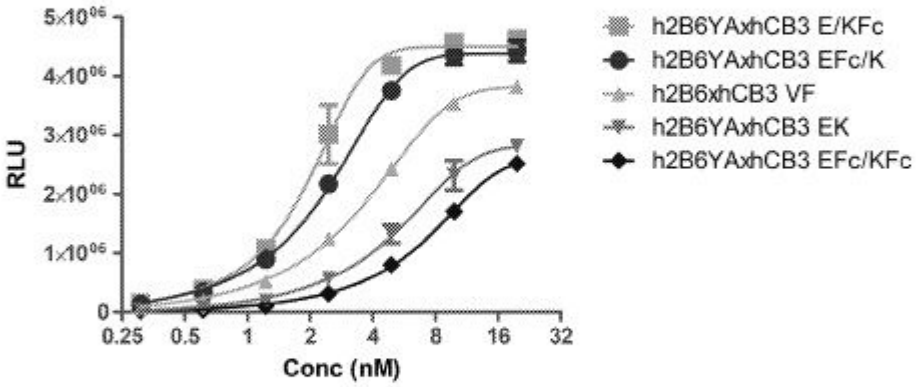

5x10^06
4x10^06
3x10^06
2x10^06
1x10^06
0
RLU
0.25
0.5
1
2
4
8
16
32
Conc (nM)
h2B6YAxhCB3 E/KFc
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6xhCB3 VF
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc

Figura 43

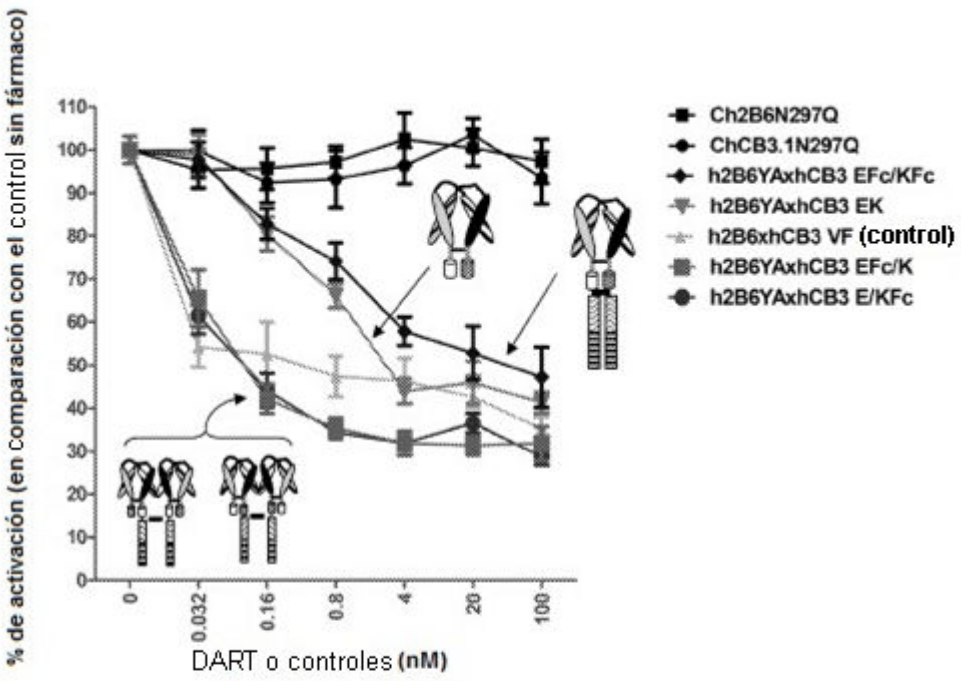

% de activación (en comparación con el control sin fármaco)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.032
0.16
0.8
4
20
100
DART o controles (nM)
Ch2B6N297Q
ChCB3.1N297Q
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6xhCB3 VF (control)
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6YAxhCB3 E/KFc

Figura 44

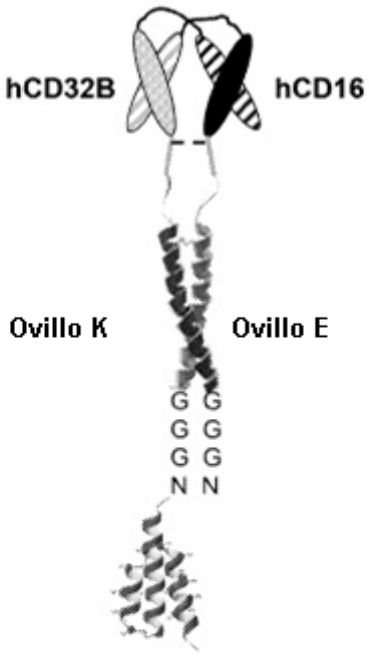


FIG. 45

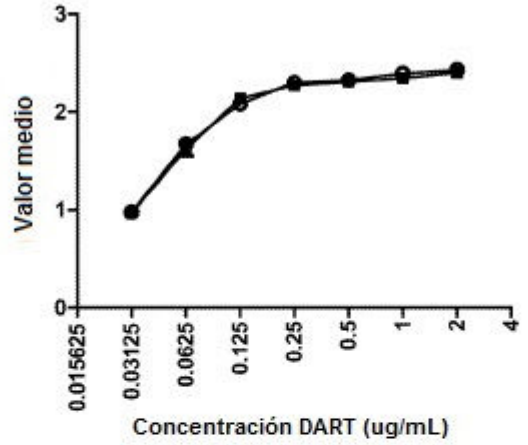


FIG. 46A

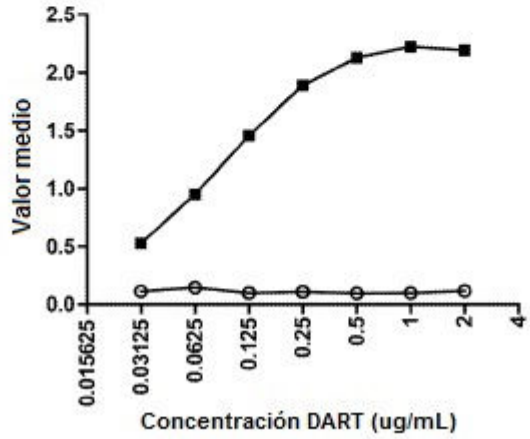


FIG. 46B

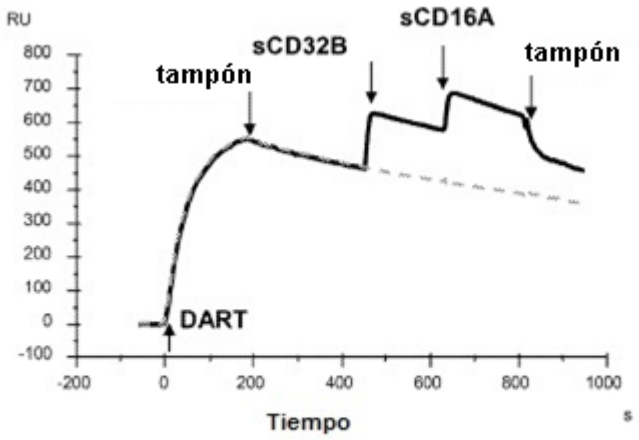
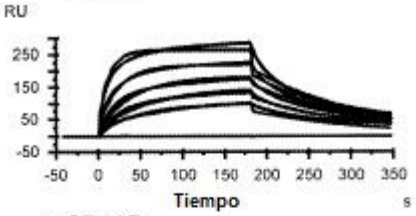

RU
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
-200
0
200
400
600
800
1000
Tiempo
s
tampón
sCD32B
sCD16A
tampón
DART

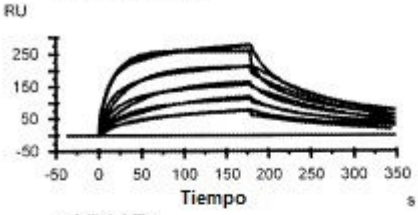
FIG. 46C

FIG. 46D
DART



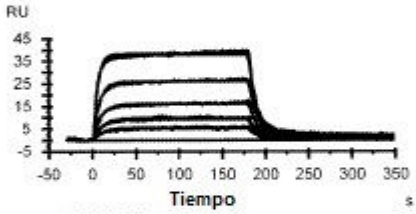
sCD32B
ka1/Ms 3.7e5 kd,1/s 7.4e-3
Kd,nM=20

FIG. 46E
ABD-DART



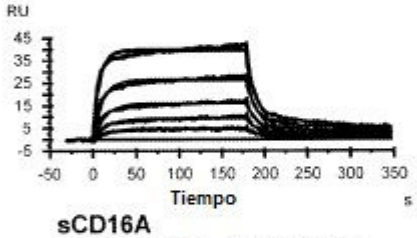
sCD32B
ka1/Ms 2.4e5 kd,1/s 7.2e-3
Kd,nM=30

FIG. 46F
DART



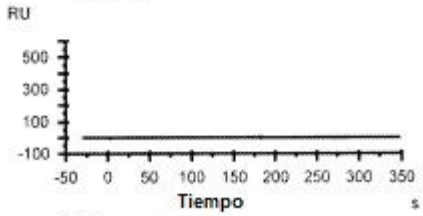
sCD16A
ka1/Ms5.7e5 kd,1/s0.090
Kd,nM=158

FIG. 46G
ABD-DART



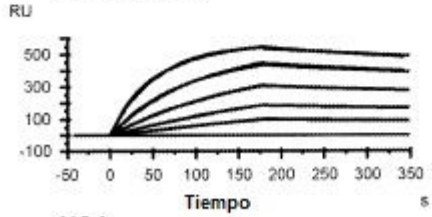
sCD16A
ka1/Ms 3.8e5 kd,1/s 0.052
Kd,nM=137

FIG. 46H
DART



HSA

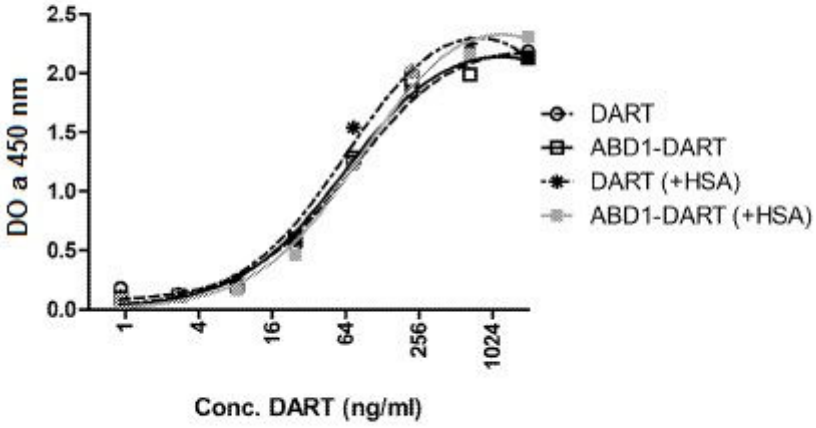
FIG. 46I
ABD-DART



HSA
ka1/Ms 0.9e5 kd,1/s 6.4e-4
Kd,nM=7.1

RU = Unidades de respuesta

FIG. 46J


DO a 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
4
16
64
256
1024
Conc. DART (ng/ml)
DART
ABD1-DART
DART (+HSA)
ABD1-DART (+HSA)

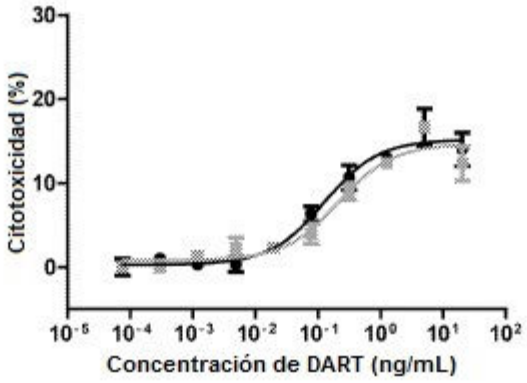


FIG. 47A

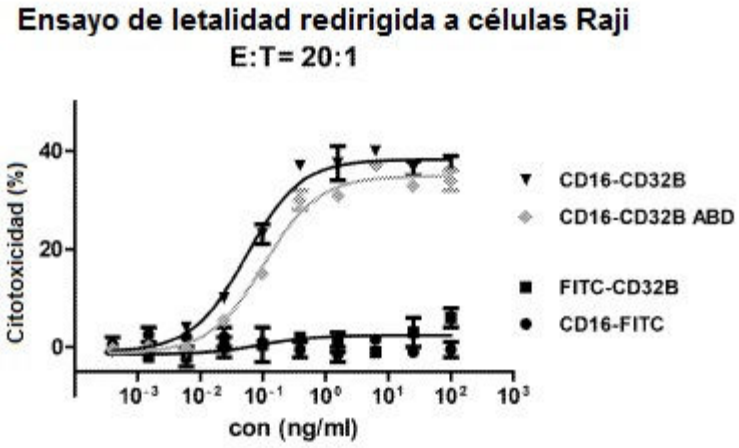


FIG. 47B

FIG. 48

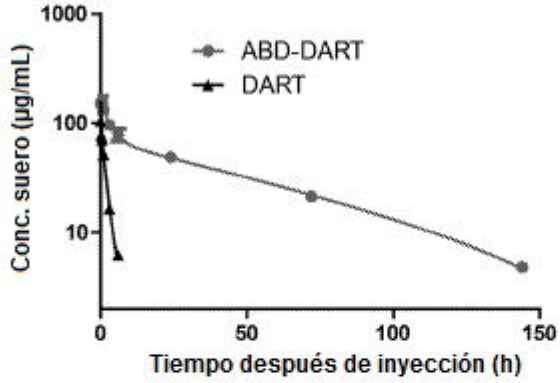


FIG. 49A

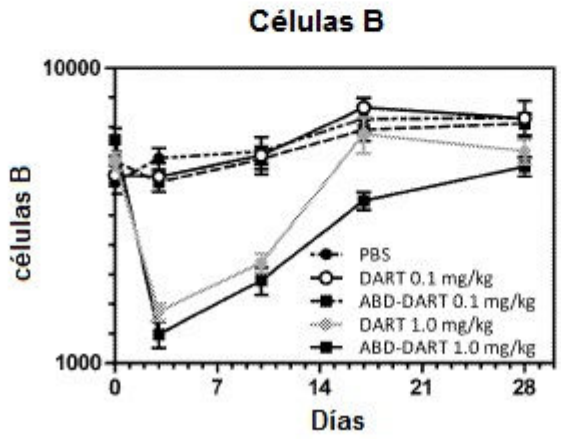


FIG. 49B

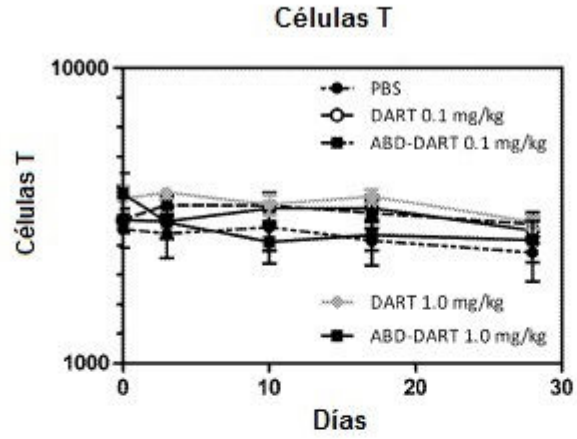
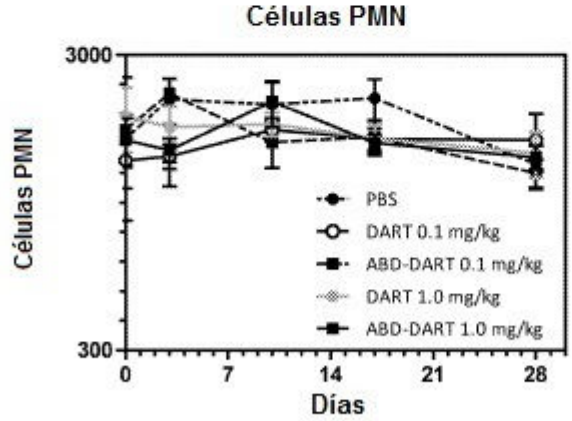


FIG. 49C



PMN = Células polimorfonucleares

FIG. 50A

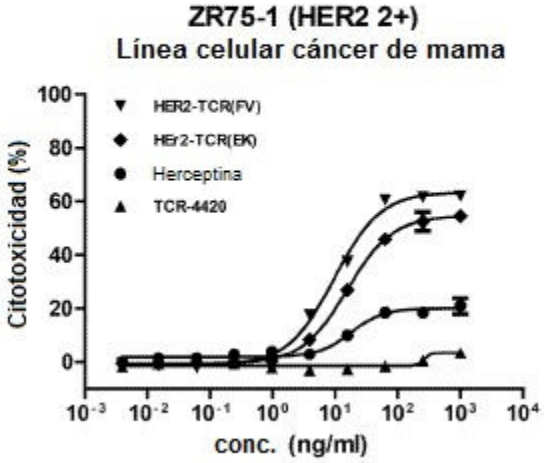


FIG. 50B

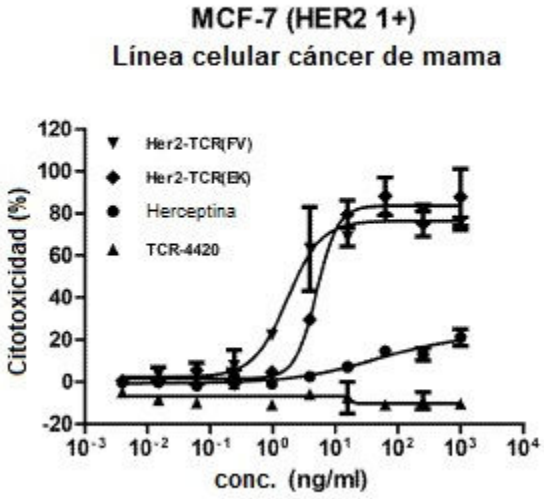


FIG. 50C

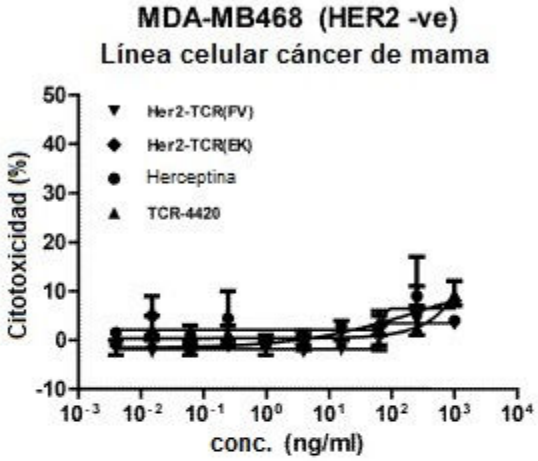


FIG. 50D

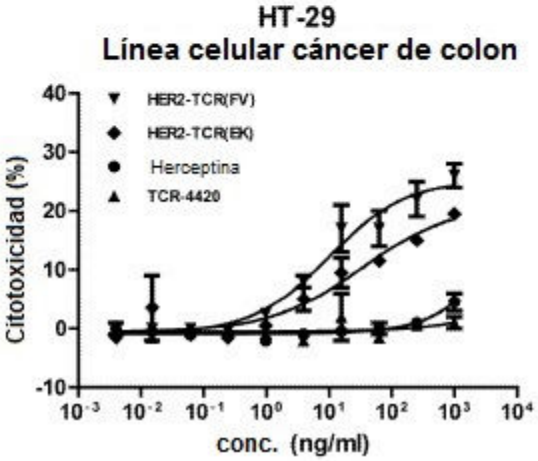


FIG. 50E

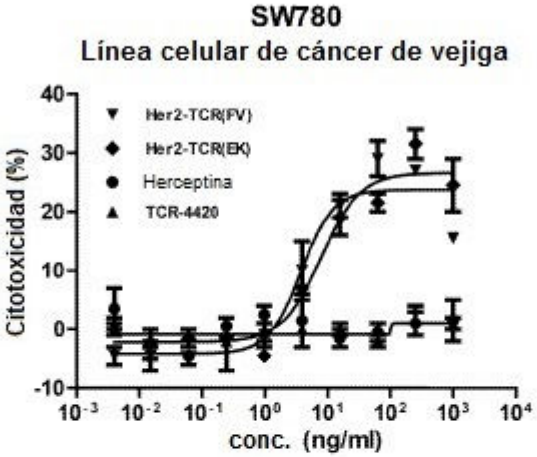


FIG. 51A

Afinidad de KYK2 4420 purificado, capturado con sFITC y detección con anticuerpo policlonal anti EK Ab 030210

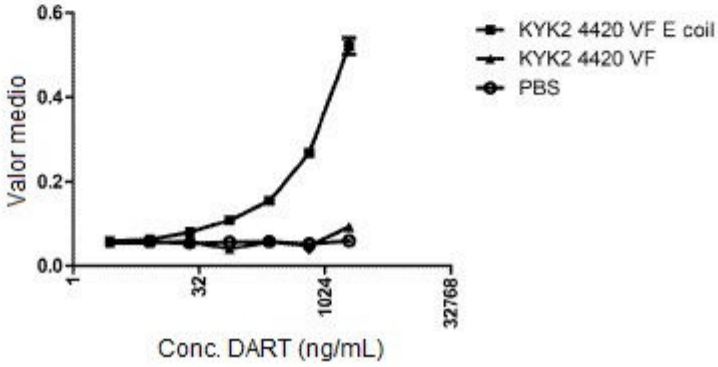
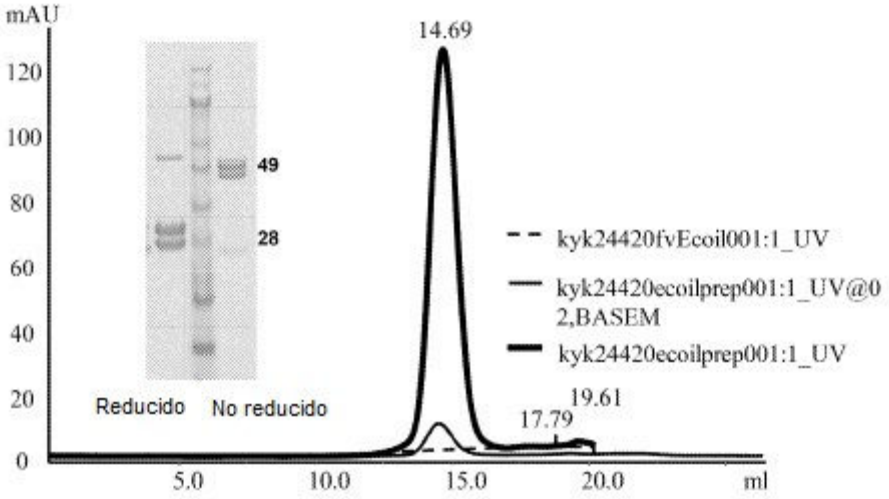


FIG 51B

KYK2-4420 VF E coil P312-009, CHO Trans.

0.45mg/L MSA Purificados



mAU = Unidades de absorbancia

FIG. 52

Afinidad de DART KYK2 4420 VF Ecoil capturado con el antígeno FITC y detectado con NKG2D Fc 012210

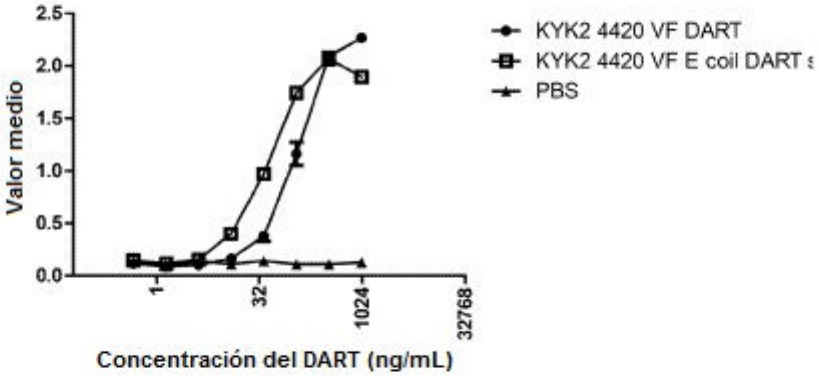
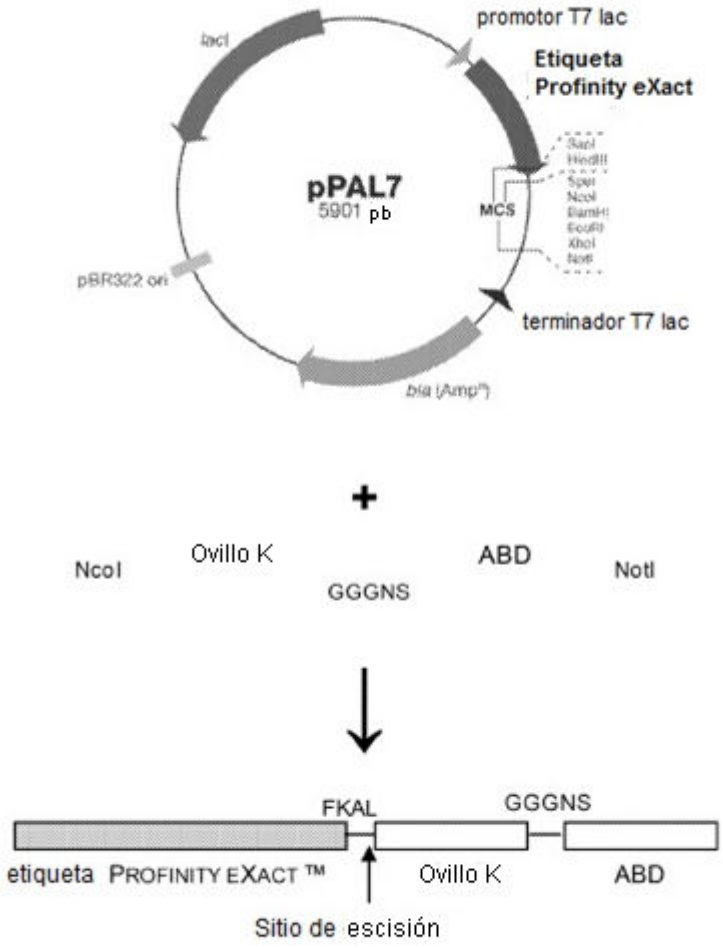


FIG. 53



pPAL7 Kcoil-ABD

FIG. 54

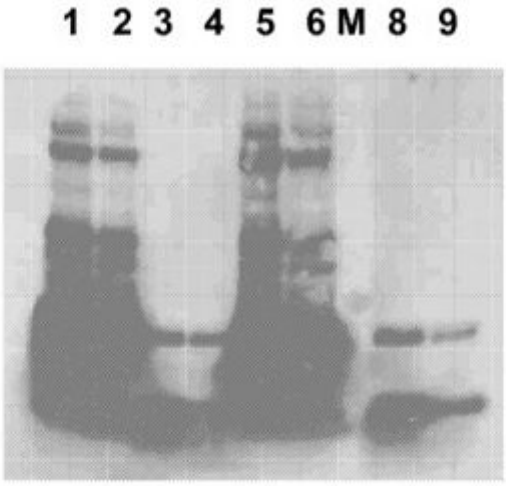

1 2 3 4 5 6 M 8 9

FIG. 55

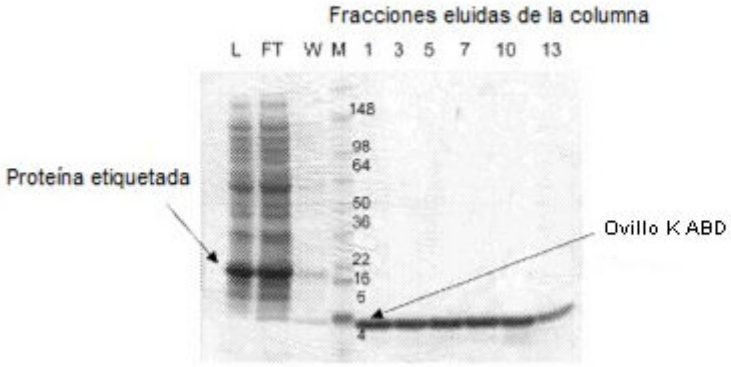

Fracciones eluidas de la columna
L FT W M 1 3 5 7 10 13
148
98
64
50
36
22
16
5
4
Proteína etiquetada
Ovillo K ABD

FIG. 56A

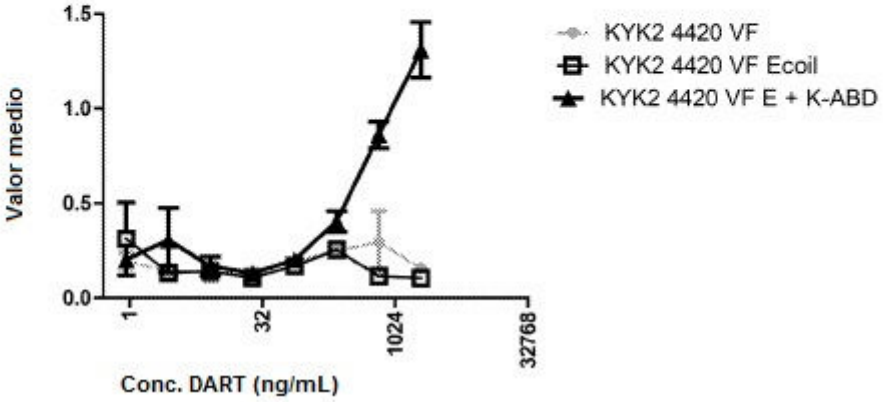


FIG. 56B

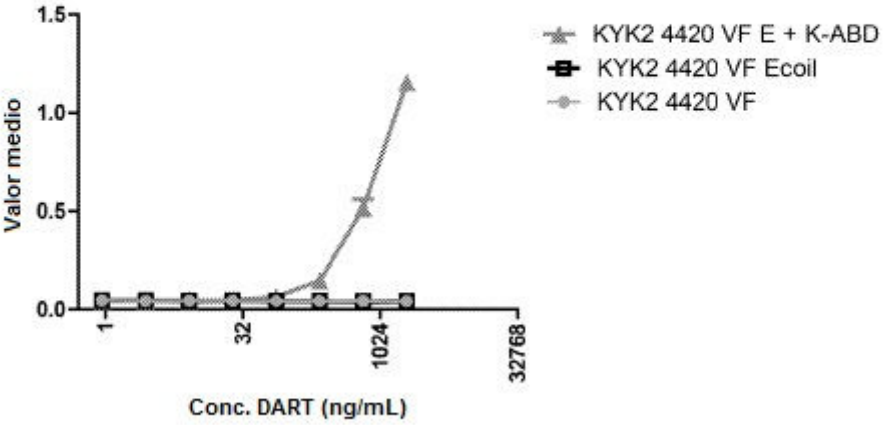
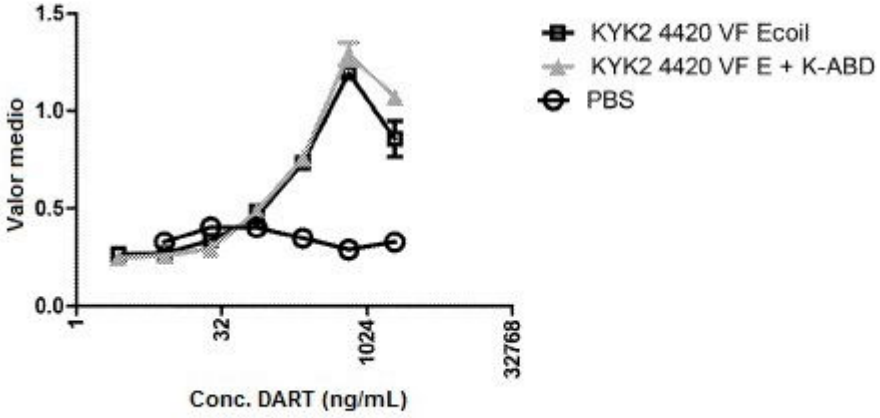


FIG. 56C


1.5
1.0
0.5
0.0
Valor medio
1
32
1024
32768
Conc. DART (ng/mL)
KYK2 4420 VF Ecoil
KYK2 4420 VF E + K-ABD
PBS