

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 258**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2010 PCT/GB2010/001711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11030107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2010 E 10754975 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2475682**

54 Título: **Anticuerpos multivalentes**

30 Prioridad:

10.09.2009 US 241159 P

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

10.05.2018

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels , BE

72 Inventor/es:

ADAMS, RALPH;

DAVE, EMMA y

HUMPHREYS, DAVID, PAUL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 667 258 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos multivalentes

5 La presente divulgación se refiere a anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, por ejemplo en los que se minimiza el impedimento estérico alrededor de cada sitio de tal modo que la afinidad por el antígeno o antígenos diana no se afecte perjudicialmente por el formato proporcionado en la presente memoria.

Son conocidos los anticuerpos multivalentes. Sin embargo, aunque el concepto básico se divulgó hace una serie de años, ha habido dificultades prácticas asociadas a la explotación de la tecnología y por tanto no se ha adoptado ampliamente para la preparación de productos biológicos farmacéuticos en desarrollo.

10 Un formato de anticuerpo no natural/no nativo puede ser difícil de expresar, lo que puede aumentar significativamente el coste de los artículos a un nivel insostenible. Los formatos pueden aumentar la inmunogenicidad o reducir la estabilidad *in vivo* en comparación con un anticuerpo o fragmento estándar y/o pueden tener una farmacocinética indeseable.

15 En particular, los problemas asociados a la preparación de productos homogéneos han sido una preocupación para los formatos no naturales. Por ejemplo, si hay más de una permutación para combinar los monómeros componentes, entonces puede dar como resultado mezclas. Por tanto, pueden requerirse métodos de purificación elaborados para aislar la entidad deseada/diana a niveles de pureza satisfactorios.

20 Esto se ha afrontado de una serie de modos, por ejemplo se ha dicho que usar ligantes cortos en la producción de anticuerpos biespecíficos ayuda a una dimerización apropiada. Sin embargo, los datos han mostrado que la orientación de los dominios variables puede influir en la expresión del formato y la formación de sitios de unión activos.

25 Se hace referencia a un enfoque para forzar el ensamblaje en la disposición u orientación deseada como el método de "botón en ojal", en que se introduce un "botón" grande en el dominio VH, por ejemplo, mediante el intercambio en algunos anticuerpos de la valina 137 por el residuo grande fenilalanina y reemplazando la leucina 45 por triptófano. Puede introducirse un ojal complementario, por ejemplo en el dominio VL, mediante la mutación en algunos anticuerpos de la fenilalanina 98 por metionina y del triptófano 87 por alanina. Sin embargo, se observó una actividad de unión a antígeno reducida para varias construcciones.

El documento WO2007/024715 intenta afrontar uno o más de estos problemas proporcionando un anticuerpo multiespecífico multivalente (DVD-Ig) del tipo mostrado en la Fig. 1.

30 Wu Chengbin *et al* Nature Biotechnology, Nature Publishing Group US vol. 25, nº 11, 1 de noviembre de 2007 discute la orientación simultánea de múltiples mediadores patológicos mediante una inmunoglobulina de dominio variable dual, concretamente una DVD-Ig.

Las DVD-Ig (por ejemplo, como se divulgan en el documento WO01/77342) se caracterizan porque el dominio variable Va está ligado directamente con el dominio variable Vb, por ejemplo por un aminoácido o péptido.

35 Sin embargo, se los presentes inventores piensan ahora que la unión *in vivo* de Va en esta disposición puede estar comprometida porque, cuando el antígeno se une al dominio Vb, entonces los efectos estéricos del antígeno unido reducen la accesibilidad de Va al antígeno y por tanto se reduce la capacidad de este último de unirse al antígeno. Si el antígeno se une a Va, entonces puede ser también cierto lo contrario.

40 Aumentar sencillamente la longitud de ligante entre Va y Vb puede aumentar sencillamente la frecuencia/posibilidad de dimerizaciones inapropiadas, conduciendo a un gasto aumentado de materiales de partida y a la necesidad de una purificación más extensa.

45 En la presente invención, generalmente en una cadena cualquiera, se proporciona un fragmento de región constante que comprende al menos CH1 o CL entre la posición correspondiente a Va y Vb. Se cree que el formato según la divulgación puede proporcionar buenos niveles de expresión porque está compuesto principalmente por componentes de anticuerpo naturales. Aún más, se cree que el problema estérico asociado al bloqueo de Va por la unión de antígeno a Vb se evita al proporcionar al menos un fragmento de región constante como espaciador.

Por tanto, se proporciona un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada del mismo que comprende:

una cadena pesada que comprende un fragmento de región constante,

estando localizado dicho fragmento de región constante entre dos dominios variables que no son un par cognado,

50 comprendiendo además la cadena pesada una región Fc con al menos un dominio seleccionado de CH2, CH3 y combinaciones de los mismos,

con la condición de que la cadena pesada no contenga más de un dominio CH1 y contenga solo dos dominios variables, y

una cadena ligera que comprende un fragmento de región constante

estando dicha región constante localizada entre dos dominios variables que no son un par cognado,

- 5 en el que dichas cadenas pesada y ligera están alineadas para proporcionar un primer sitio de unión formado por un primer par cognado de dominios variables y un segundo sitio de unión formado por un segundo par cognado de dominios variables,

y

- 10 en el que el fragmento de región constante de la cadena pesada consiste en un dominio CH1 o un dominio CL, con la condición de que cuando el fragmento de región constante en la cadena pesada sea un dominio CH1, el fragmento de región constante en la cadena ligera consista en un dominio CL, y cuando el fragmento de región constante de la cadena pesada sea un dominio CL, el fragmento de región constante de la cadena ligera consista en un dominio CH1.

Breve descripción de las Figuras

- 15 Figura 1 muestra un anticuerpo de la técnica anterior conocido como DVD-Ig que contiene cadenas pesada y ligera

- Figura 2 muestra cinco componentes de cadena pesada/ligera diferentes de cinco formatos de anticuerpo diferentes según la presente invención, que comprenden un primer par cognado en el que el VH del mismo está fusionado con un fragmento de CH1 y el VL del mismo está fusionado con un fragmento de CL. Los fragmentos de CH1 y CL están también ligados a través de un péptido con un VH o VL adicional, según sea apropiado, de un segundo par cognado. La cadena pesada comprende además un fragmento CH2CH3.
- 20

En el primer formato, hay un enlace disulfuro en el segundo par cognado. En el segundo formato, hay un enlace disulfuro en el primer par cognado. En el tercer formato, hay un enlace disulfuro en el primer y segundo pares cognados.

- 25 En el cuarto formato, hay un enlace disulfuro en el segundo par cognado y entre los fragmentos de región constante CH y CL. En el quinto formato, hay un enlace disulfuro entre los fragmentos de región constante CH y CL.

Cada uno de los componentes de cadena pesada/ligera mostrados puede asociarse con otro de tales componentes proporcionando un anticuerpo de la presente divulgación.

- 30 Cada uno del primer, segundo y tercer formatos puede proporcionarse también en un formato con un enlace disulfuro en la región constante.

Figura 3A A muestra un formato de anticuerpo según la presente divulgación en el que hay una estabilización de disulfuro entre el segundo par de dominios variables.

B muestra un formato de anticuerpo según la presente divulgación en el que hay una estabilización de disulfuro entre los fragmentos de bisagra de Fc.

- 35 C muestra un formato de anticuerpo según la presente divulgación con estabilización de disulfuro entre el par de dominios variables y los fragmentos de bisagra de Fc del anticuerpo.

D muestra un formato de anticuerpo según la presente divulgación con enlaces disulfuro en la región constante y también en la región Fc.

- 40 Figura 3B E muestra un formato de componente de cadena pesada/ligera según la presente divulgación en el que la región Fc comprende

CH2CH3liganteCH2CH3. El formato tiene un enlace disulfuro entre los dominios variables del segundo par cognado y tiene también uno entre los dos dominios CH2 o regiones de bisagra.

- 45 E muestra un formato de componente de cadena pesada/ligera según la presente divulgación en el que la región Fc comprende CH2CH3liganteCH2CH3. El formato tiene también un enlace disulfuro entre los dominios CH y CL y tiene también uno entre los dos dominios CH2 o regiones de bisagra.

G muestra un formato de anticuerpo según la presente divulgación con enlaces disulfuro entre la región constante CH y CL, un par de dominios variables y también la región de bisagra de Fc.

H muestra un formato de anticuerpo según la presente divulgación con enlaces disulfuro entre la región constante CH y CL y también en un par de dominios variables en cada componente de

cadena pesada/ligera.

Figuras 4-7 muestran secuencias de anticuerpos y fragmentos de los mismos

Figura 8 muestra un análisis de PAGE-SDS de anticuerpos según la invención

Figura 9 muestra secuencias de anticuerpos y fragmentos de los mismos

- 5 En una disposición alternativa, el CL en la cadena ligera se reemplaza por CH1 y se proporciona a la cadena pesada un CL, por ejemplo reemplazando al dominio CH1 de la misma.

Anticuerpo como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a un formato que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en la disposición de tipo Y tradicional característica de anticuerpos.

- 10 Es un componente de cadena pesada/ligera según la presente divulgación una cadena pesada y la cadena ligera asociada.

La cadena pesada como se emplea en la presente memoria es la cadena que comprende la región Fc.

La cadena ligera como se emplea en la presente memoria no comprende una región Fc.

Los dominios variables se proporcionan en cada cadena de tal modo que formen pares predefinidos con unión adecuada/aceptable a un antígeno diana.

- 15 Los pares de dominios variables adecuados pueden identificarse mediante cualquier medio posible, por ejemplo incluyendo la generación de anticuerpos en hospedadores y el cribado de linfocitos B. Como alternativa, los pares adecuados pueden identificarse por exhibición en fago. En una realización, el par de dominios variables tiene una afinidad por un antígeno diana de 100 nM o menos, tal como 50 nM o menos, en particular 1 nM o menos.

- 20 Los métodos de exhibición en fago son conocidos en la materia e incluyen aquellos divulgados por Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 1995, 182, 41-50; Ames et al., J. Immunol. Methods, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. Eur. J. Immunol., 1994, 24, 952-958; Persic et al., Gene, 1997 187, 9-18; y Burton et al., Advances in Immunology, 1994, 57, 191-280; documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982 y WO 95/20401; y documentos US 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.

- 25 Los ratones transgénicos, u otros organismos incluyendo otros mamíferos, pueden usarse para generar anticuerpos humanizados.

En una realización, el par de dominio variable es un par cognado.

Par cognado como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a un par natural de dominios variables, es decir aislado de un solo anticuerpo o célula que expresa anticuerpo.

- 30 En un ejemplo, el par cognado es un par de VH/VL complementarios que se une al antígeno cooperativamente, concretamente son un par de VH/VL complementarios. En un ejemplo, el par de VH/VL es monoespecífico.

Típicamente, serán un par de VH/VL derivado del mismo anticuerpo.

En un ejemplo, el par cognado es un par de dominios variables aislados de un par de una "colección de pares", tal como una colección de exhibición en fago de Fab.

- 35 El primer y segundo sitios de unión son términos relativos (relativos entre sí) y son etiquetas nominales dadas a los sitios de unión para diferenciarlos entre sí. Si un sitio de unión se marca "el primero", entonces el otro se marca "el segundo".

El primer y segundo par cognados son también etiquetas relativas para diferenciar nominalmente los pares. Un par marcado "primer par" en la presente memoria no es definitivo para la posición en la molécula.

- 40 Los dominios variables pueden haberse optimizado y/o humanizado.

Los dominios variables optimizados/humanizados derivados de un par cognado seguirán considerándose un par cognado después de optimización/humanización.

CL como se emplea en la presente memoria hace referencia a la porción de región constante en la cadena ligera, que puede ser una región constante de cadena ligera de origen natural.

- 45 Fragmento de región constante como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a la porción de región constante localizada entre dos dominios variables, por ejemplo dominios variables no cognados, en la cadena pesada. El fragmento de región constante se caracteriza porque está enlazado con dos dominios variables en la

cadena de la que forma parte.

Fusionado como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a una secuencia aminoacídica continua que no está interrumpida, concretamente ligada directamente a través de un enlace peptídico, por ejemplo directamente con la secuencia del dominio variable o a la inversa al fragmento de región constante y no unida por un ligante. Insertar un ligante peptídico no natural en una secuencia aminoacídica desestabiliza la secuencia, y por tanto una secuencia que contiene un ligante peptídico no se consideraría que fusiona las porciones relevantes dentro del significado de la presente memoria descriptiva. La adición de un ligante peptídico natural sería considerada también como interrupción de la secuencia aminoacídica si no puede considerarse que forma parte de la secuencia de uno o más de los componentes relevantes, tal como un dominio variable o fragmento de región constante.

En una realización, se proporciona un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo según la presente divulgación

en el que dichas cadenas pesada y ligera están alineadas para proporcionar un primer sitio de unión formado por un primer par cognado de dominios variables y un segundo sitio de unión formado por un segundo par cognado de dominios variables,

En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo según la presente divulgación es multivalente, por ejemplo divalente, trivalente o tetravalente. Es decir, tiene dos, tres o cuatro sitios de unión.

En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo se une con avidéz al antígeno diana.

En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo según la presente divulgación es monoespecífico. Monoespecífico como se emplea en la presente memoria hace referencia al hecho de que todos los sitios de unión se unen al mismo antígeno diana. En un aspecto de esta realización, todos los sitios de unión se unen al mismo epítipo o epitopos de dicho antígeno. En una realización alternativa, al menos dos sitios de unión se unen a diferentes epitopos en el antígeno diana.

En una realización, un anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera según la presente divulgación es biespecífico de tal modo que dos sitios de unión se unen específicamente a antígenos diferentes o distintos. En un ejemplo, el primer par cognado se une a un primer antígeno y el segundo par cognado se une a un segundo antígeno.

Se une específicamente como se emplea en la presente memoria pretende hacer referencia a anticuerpos que tienen una alta afinidad por un antígeno diana (del que son específicos) y que se unen a antígenos de los que no son específicos con una afinidad baja o mucho menor (o ninguna en absoluto). Los métodos de medida de la afinidad son conocidos por los especialistas en la materia e incluyen ensayos tales como BIAcore.

En una realización, el enlace disulfuro "natural" está presente entre CH1 y CL. El dominio CL deriva de Kappa o Lambda. La posición natural para un enlace que forma cisteína en cKappa y cLambda humanos es en la posición 214 (Numeración de Kabat en la 4ª edición de 1987 de Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU.). La secuencia de cKappa se proporciona en la SEQ ID NO:81 (Figura 6).

La localización exacta del enlace que se forma en la cisteína en CH1 depende del dominio particular empleado realmente. Por tanto, por ejemplo en gamma-1 humana, la posición natural del enlace disulfuro está localizada en la posición 233 (Numeración de Kabat en la 4ª edición de 1987). La posición del enlace que forma cisteína para otros isotipos humanos tales como gamma 2, 3, 4, IgM e IgE es la posición 127 y para los isotipos humanos IgD e IgA2B es la posición 128.

En una realización, el anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo según la divulgación tiene un enlace disulfuro en una posición equivalente o correspondiente a la del CH o CL de origen natural.

En una realización, el fragmento de región constante que comprende CH o CL tiene un enlace disulfuro que no está en una posición de origen natural. Este puede genomanipularse en la molécula introduciendo una cisteína o cisteínas en la cadena aminoacídica en las posiciones requeridas. Este enlace disulfuro no natural está además de o como alternativa al enlace disulfuro natural presente entre CH y CL.

En una realización, no está presente enlace disulfuro entre CH y CL, por ejemplo una o más de las cisteínas intercatenarias naturales se ha reemplazado por otro aminoácido, tal como serina.

En una realización, cada fragmento de región constante está fusionado con un dominio variable. En un ejemplo, el fragmento de región constante de cadena pesada está fusionado con un dominio VH y el fragmento de región constante de cadena ligera está fusionado con un dominio VL.

En un ejemplo, el fragmento de región constante de cadena pesada está fusionado con el dominio VH del primer par

cognado y el fragmento de región constante de cadena ligera está fusionado con el dominio VL del primer par cognado.

5 En una realización, cada fragmento de región constante está también ligado a través de un péptido, por ejemplo un ligante artificial/de origen no natural tal como la secuencia en la Tabla 2, con un dominio variable, por ejemplo que es un par no cognado con el dominio variable fusionado con el mismo.

En un ejemplo, el fragmento de región constante de cadena pesada está ligado a través de un péptido con el dominio VH del segundo par cognado y el fragmento de región constante de cadena ligera está ligado a través de un péptido con el dominio VL del segundo par cognado.

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

15 En una realización, los dominios variables de al menos un par de dominios variables tales como un par cognado están ligados por un enlace disulfuro. Típicamente, esos pares de dominios variables estarán ligados por un enlace disulfuro entre dos cisteínas genomanipuladas, una en VH y otra en VL.

Las posiciones adecuadas para introducir cisteínas genomanipuladas son conocidas en la materia, algunas de las cuales se enumeran a continuación. Se apreciará que pueden existir otras posiciones adecuadas.

En una realización, el enlace disulfuro está entre (a menos que el contexto indique otra cosa, se emplea la numeración de Kabat en la lista siguiente):

- 20
- VH37 + VL95C véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);
 - VH44 + VL100 véanse por ejemplo; Biochemistry 33 5451-5459 Reiter et al (1994) o Journal of Biological Chemistry Vol. 269 nº 28 pág.18327-18331 Reiter et al (1994) o Protein Engineering, vol.10 nº 12 pág.1453-1459 Rajagopal et al (1997);
 - VH44 + VL105 véase por ejemplo J Biochem. 118, 825-831 Luo et al (1995);

25

 - VH45 + VL87 véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);
 - VH55 + VL101 véase por ejemplo FEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995);
 - VH100 + VL50 véase por ejemplo Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber et al (1990);
 - VH100b + VL49;
 - VH98 + VL 46 véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);

30

 - VH101+ VL 46 o
 - VH105 + VL43 véanse por ejemplo; Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 pág.7538-7542 Brinkmann et al (1993) o Proteins 19, 35-47 Jung et al (1994).
 - VH106 + VL57 véase por ejemplo FEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995)

35 Los pares aminoacídicos enumerados anteriormente están en posiciones favorables al reemplazo por cisteínas de tal modo que puedan formarse enlaces disulfuro. Las cisteínas pueden genomanipularse en estas posiciones mediante técnicas conocidas.

40 Por consiguiente, en una realización, un par de dominios variables de la presente invención está ligado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína genomanipulados, uno en VH y otro en VL, en la que la posición del par de residuos de cisteína genomanipulados se selecciona del grupo consistente en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

45 En una realización, un par de dominios variables de la presente invención está ligado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína genomanipulados, uno en VH y otro en VL, que están fuera de las CDR, en la que la posición del par de residuos de cisteína genomanipulados se selecciona del grupo consistente en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

En una realización, un par de dominios variables de la presente invención está ligado por un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína genomanipulados, en la que el residuo de cisteína genomanipulado de VH está en posición

44 y el residuo de cisteína genomanipulado de VL está en posición 100.

En una realización, hay un enlace disulfuro entre los dominios variables que forman un primer sitio de unión, por ejemplo en el primer par cognado.

5 En una realización, hay un enlace disulfuro entre los dominios variables que forman un segundo sitio de unión, por ejemplo en el segundo par cognado.

En una realización, hay un enlace disulfuro entre los dominios variables que forman un primer sitio de unión y un enlace disulfuro adicional entre los dominios variables que forman un segundo sitio de unión. Se apreciará que las localizaciones de los pares de cisteína en cada de uno de los pares cognados pueden ser iguales o diferentes.

10 En una o más realizaciones de la presente memoria, no hay enlaces disulfuro intercatenarios en las regiones Fc, por ejemplo en la región de bisagra de las mismas.

Como alternativa, una o más realizaciones de la presente memoria pueden proporcionarse con uno o más (tales como dos) enlaces disulfuro en las regiones Fc, tal como la región de bisagra de las mismas.

15 En una realización, hay un enlace disulfuro entre los pares de dominios variables que forman un primer sitio de unión y/o los dominios variables que forman un segundo sitio de unión y uno o más enlaces disulfuro entre las regiones Fc, tal como la región de bisagra de las mismas.

En una realización, hay un enlace disulfuro entre los dominios variables del primer par cognado y/o los dominios variables del segundo par cognado y un enlace disulfuro entre los fragmentos de región constante, tales como CH o CL. Estos últimos pueden incluir opcionalmente uno o más enlaces disulfuro entre las regiones Fc, tales como la región de bisagra de las mismas.

20 Un enlace o enlaces disulfuro en la región Fc puede estar en un área correspondiente aproximadamente a la región de bisagra en anticuerpos naturales.

Pueden emplearse regiones Fc modificadas, por ejemplo como se divulga en el documento WO2008/131242.

25 En una realización, el fragmento de región constante, por ejemplo en la cadena pesada, comprende un dominio CH1. En una realización, el fragmento de región constante consiste en un dominio CH1. En una realización, se usa un dominio CH1 modificado que termina en la cisteína intercatenaria, por ejemplo en posición 233 (Numeración de Kabat en la 4ª edición de 1987) de IgG1. La secuencia de un CH1 de IgG1 modificado que termina en la cisteína intercatenaria se proporciona en la Figura 5 (SEQ ID NO: 70).

30 En una realización, el fragmento de región constante, por ejemplo en la cadena ligera, comprende un dominio CL. En una realización, el fragmento de región constante en la cadena ligera consiste en un dominio CL. En una realización, el fragmento de región constante en la cadena ligera consiste en cKappa o cLambda.

En una realización, la cadena ligera comprende un dominio CL. En una realización, la región constante en la cadena ligera consiste en un dominio CL, por ejemplo cKappa (SEQ ID NO:81).

Por consiguiente, en una realización, se proporciona un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada/ligera del mismo que comprende:

35 una cadena pesada que comprende un fragmento de región constante consistente en CH1, estando localizado dicho fragmento de región constante entre dos dominios variables que no son un par cognado, comprendiendo además la cadena pesada una región Fc con al menos un dominio seleccionado de CH2, CH3 y combinaciones de los mismos,

con la condición de que la cadena pesada contenga solo un CH1 y contenga solo dos dominios variables, y

40 una cadena ligera que comprende un fragmento de región constante consistente en un dominio CL localizado entre dos dominios variables que no son un par cognado,

en el que dichas cadenas pesada y ligera están alineadas para proporcionar un primer sitio de unión formado por un primer par cognado de dominios variables y un segundo sitio de unión formado por un segundo par cognado de dominios variables,

45 En una realización, la región Fc comprende dominios CH2 y/o CH3. En una realización, el fragmento Fc N-terminal es -CH2CH3, véase por ejemplo CH2CH3 de IgG1 como se muestra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 87). En una realización alternativa, la región Fc comprende o consiste en -CH2CH3CH2CH3 N-terminal. Esta última puede estar proporcionada con un ligante entre el CH3 medio y CH2 (tal como -CH2CH3liganteCH2CH3) para permitir al CH2CH3 terminal flexibilidad para alinearse con el primer CH2CH3 (que está enlazado con el extremo C del resto de la molécula). Véase por ejemplo el documento WO2008/012543. Esta disposición de Fc puede prolongar la semivida

50

y/o permitir flexibilidad para controlar/proporcionar fragmentos de anticuerpo que no son reticulantes, si se desea.

5 En una realización, desde el extremo N la cadena pesada se dispone como sigue: un dominio variable (por ejemplo del primer par cognado), CH1 y un dominio variable (por ejemplo del segundo par cognado), CH2 y CH3. En esta disposición, CH1 puede estar fusionado, por ejemplo, con el dominio variable de, por ejemplo, el primer par cognado y ligado a través de un péptido con el dominio variable de, por ejemplo, el segundo par cognado.

En un ejemplo, el extremo N de CH1 está fusionado con el extremo C de un dominio variable del primer par cognado y el extremo C de CH1 está ligado a través de un péptido con el extremo N de un dominio variable del segundo par cognado.

10 En una realización, desde el extremo N la cadena pesada se dispone como sigue: un VH (por ejemplo del primer par cognado), un CH1, un VH (por ejemplo del segundo par cognado), CH2 y CH3, por ejemplo en esta disposición CH1 puede estar fusionado con un VH, por ejemplo del primer par cognado, y ligado a través de un péptido con el VH de, por ejemplo, el segundo par cognado.

15 En una realización, desde el extremo N la cadena pesada se dispone como sigue: un VL (por ejemplo del primer par cognado), un CH1, un VL (por ejemplo del segundo par cognado), CH2 y CH3, por ejemplo en esta disposición CH1 puede estar fusionado con un VL de, por ejemplo, el primer par cognado, y ligado a través de un péptido con el VL de, por ejemplo, el segundo par cognado.

20 En una realización, desde el extremo N la cadena pesada se dispone como sigue: un VH (por ejemplo del primer par cognado), un CH1, un VL (por ejemplo del segundo par cognado), CH2 y CH3, por ejemplo en esta disposición CH1 puede estar fusionado con el VH del primer par cognado, y ligado a través de un péptido con el VL de, por ejemplo, el segundo par cognado.

En una realización, desde el extremo N la cadena pesada se dispone como sigue: un VL (por ejemplo del primer par cognado), un CH1, un VH (por ejemplo del segundo par cognado), CH2 y CH3, por ejemplo en esta disposición el CH1 puede estar fusionado con el VL de, por ejemplo, el primer par cognado, y ligado a través de un péptido con el VH de, por ejemplo, el segundo par cognado.

25 En una realización, desde el extremo N la cadena ligera se dispone como sigue: un VL (por ejemplo de un primer par cognado), un CL y un VL (por ejemplo de un segundo par cognado), por ejemplo un CL puede estar fusionado con el VL de, por ejemplo, el primer par cognado y ligado a través de un péptido con el VL de, por ejemplo, el segundo par cognado.

30 En un ejemplo, el extremo N del dominio CL está fusionado con el extremo C de un dominio variable del primer par cognado y el extremo C del dominio CL está ligado a través de un péptido con el extremo N de un dominio variable del segundo par cognado.

35 En una realización, desde el extremo N la cadena ligera se dispone como sigue: un VL (por ejemplo de un primer par cognado), un CL y un VH (por ejemplo de un segundo par cognado), por ejemplo CL puede estar fusionado con el VL de, por ejemplo, el primer par cognado y ligado a través de un péptido con el VH de, por ejemplo, el segundo par cognado.

40 En una realización, desde el extremo N la cadena ligera se dispone como sigue: un VH (por ejemplo de un primer par cognado), un CL y un VL (por ejemplo de un segundo par cognado), por ejemplo un CL puede estar fusionado con el VH de, por ejemplo, el primer par cognado y ligado a través de un péptido con el VL de, por ejemplo, el segundo par cognado.

En una disposición alternativa, el CL en la cadena ligera se reemplaza por CH1 y se proporciona a la cadena pesada un CL, por ejemplo reemplazando al dominio CH1 de la misma.

Las cadenas pesada y ligera se elegirán para forman los dominios de unión requeridos.

45 En una realización, los componentes de cadena pesada/ligera individuales se unen entre sí proporcionando un anticuerpo por un enlace disulfuro, por ejemplo en la región de bisagra de las cadenas pesadas. Pueden emplearse bisagras modificadas como en la Tabla 1.

Se han descrito ya una serie de regiones de bisagra modificadas, por ejemplo en los documentos US5.677.425, US6642356, WO9915549, WO2005003170, WO2005003169, WO2005003170, WO9825971 y WO2005003171. La bisagra se localizará habitualmente entre el segundo dominio variable en la cadena pesada y la región Fc (CH2CH3). Los ejemplos particulares de bisagras incluyen aquellas mostradas en la Tabla 1.

50

Tabla 1. Secuencias ligantes de bisagra

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|----------------------------------|
| 1 | DKTHTCAA |
| 2 | DKTHTCPPCP A |
| 3 | DKTHTCPPCPATCPPCPA |
| 4 | DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA |
| 5 | DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY |
| 6 | DKTHTCPPCP AGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY |
| 7 | DKTHTCCVECPCPA |
| 8 | DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA |
| 9 | DKTHTCPSCPA |

5 En un ejemplo, la región Fc comprende además una región de bisagra consistente en la secuencia dada en una cualquiera de las SEQ ID NO 1-9. En un ejemplo, la región Fc tiene la secuencia dada en la Figura 5 (SEQ ID NO:76).

La disposición de CL en la cadena ligera y de CH1 en el fragmento de región constante de cadena pesada se piensa que minimiza la dimerización inapropiada.

Los inventores creen que proporcionar dominios variables como pares cognados en el Construcción final esto optimiza y mantiene las propiedades de unión a antígeno del sitio de unión formado por el par relevante.

10 Se cree que los puentes disulfuro en los pares cognados son ventajosos porque ayudan a estabilizar el formato.

Se dan a continuación ejemplos de ligantes peptídicos adecuados, por ejemplo en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias ligantes flexibles

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|--------------------------|
| 10 | SGGGGSE |
| 11 | DKTHTS |
| 12 | (S)GGGGS |
| 13 | (S)GGGSGGGGS |
| 14 | (S)GGGSGGGSGGGGS |
| 15 | (S)GGGSGGGSGGGSGGGGS |
| 16 | (S)GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS |
| 17 | AAAGSG-GASAS |

ES 2 667 258 T3

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|------------------------------------|
| 18 | AAAGSG- XGGGS-GASAS |
| 19 | AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS |
| 20 | AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS |
| 21 | AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS |
| 22 | AAAGSG-XS-GASAS |
| 23 | PGNRGTTTTRRPATTGSSPGPTQSHY |
| 24 | ATTTGSSPGPT |
| 25 | ATTTGS |
| - | GS |
| 26 | EPSGPISTINSPPSKESHKSP |
| 27 | GTVAAPSVFIFPPSD |
| 28 | GGGGIAPSMVGGGGS |
| 29 | GGGGKVEGAGGGGGS |
| 30 | GGGGSMKSHDGGGGS |
| 31 | GGGGNLITIVGGGGS |
| 32 | GGGGVPSLPGGGGS |
| 33 | GGEKSIPGGGGS |
| 34 | RPLSYRPPFPFGFPSVRP |
| 35 | YPRSIYIRRRHPSPLTT |
| 36 | TPSHLSHILPSFGLPTFN |
| 37 | RPVSPFTFPRLSNSWLPA |
| 38 | SPA AHFPRSIPRPGPIRT |
| 39 | APGPSAPSHRSLPSRAFG |
| 40 | PRNSIHFLHPLLVA PLGA |
| 41 | MPSLSGVLQVRYLSPPDL |
| 42 | SPQYPSPLTLTLPHPSL |

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|--|--------------------|
| 43 | NPSLNPPSYLHRAPSRIS |
| 44 | LPWRTSLLPSLPLRRRP |
| 45 | PPLFAKGPVGLLSRSFPP |
| 46 | VPPAPVVSLRSAHARPPY |
| 47 | LRPTPPRVRSYTCCPTP- |
| 48 | PNVAHVLPLLTVPWDNLR |
| 49 | CNPLLPLCARSPAVRTFP |
| (S) es opcional en las secuencias 13 a 16. | |

Los ejemplos de ligantes rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO:64), PPPP (SEQ ID NO:65) y PPP.

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

- 5 Se proporcionan ejemplos de péptidos de unión a albúmina en el documento WO 2007/106120 e incluyen:

Tabla 3

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|-----------------------|
| 50 | DLCLRDWGCLW |
| 51 | DICLPRWGCLW |
| 52 | MEDICLPRWGCLWGD |
| 53 | QRLMEDICLPRWGCLWEDDE |
| 54 | QGLIGDICLPRWGCLWGRSV |
| 55 | QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK |
| 56 | EDICLPRWGCLWEDD |
| 57 | RLMEDICLPRWGCLWEDD |
| 58 | MEDICLPRWGCLWEDD |
| 59 | MEDICLPRWGCLWED |
| 60 | RLMEDICLARWGCLWEDD |
| 61 | EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG |
| 62 | RAPESFVCYWETICFERSEQ |
| 63 | EMCYFPGICWM |

Típicamente, estos ligantes peptídicos se usan para conectar el extremo C de CH1 con el extremo N del dominio variable del segundo par cognado (típicamente VH) y el extremo C de CL con el extremo N de un dominio variable del segundo par cognado (típicamente VL). Por consiguiente, el ligante peptídico puede ser uno cualquiera de los ligantes proporcionados en las SEQ ID NO 10-65 o PPPP o GS. En un ejemplo, el ligante puede ser uno cualquiera de los ligantes proporcionados en las SEQ ID NO 13-16 pero que carece de la serina N-terminal (S). Preferiblemente, el ligante peptídico es SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:72).

Se apreciará que pueden hacerse una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones aminoacídicas en los dominios variables de anticuerpo proporcionados por la presente invención sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno diana y neutralizar la actividad del mismo. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o deleción aminoacídica puede probarse fácilmente por un especialista en la materia, por ejemplo usando ensayos *in vitro*, por ejemplo un ensayo BIAcore.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, pueden usarse dominios de región constante de IgG humanos, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando la molécula de anticuerpo se pretende para usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo se pretenda para fines terapéuticos y no se requieran funciones efectoras de anticuerpo. Se apreciará que pueden usarse también las variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, pueden usarse moléculas de IgG4 en que la serina en posición 241 se ha cambiado por prolina como se describe en Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108. Se entenderá también por un especialista en la materia que los anticuerpos pueden experimentar una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y extensión de estas modificaciones a menudo dependen de la estirpe celular hospedadora usada para expresar el anticuerpo así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones de glicosilación, oxidación, formación de dicetipiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Es una modificación frecuente la pérdida del residuo básico carboxiterminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705: 129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena del dominio Fc de anticuerpo dada en las Figuras 5 y 9 y las SEQ ID NO: 76 y 87 puede estar ausente.

En una realización, la cadena pesada de anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera de anticuerpo comprende un dominio CL, o bien kappa o bien lambda.

Las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación tienen adecuadamente una alta afinidad de unión por cada antígeno, en particular picomolar. La afinidad puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la materia, incluyendo BIAcore. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación

tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación tiene una afinidad de unión de aproximadamente 30 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es totalmente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor.

Las moléculas de anticuerpo o componentes de cadena pesada/ligera del mismo de la presente divulgación pueden unirse a uno o más antígenos de interés y son capaces de unirse a al menos dos antígenos simultáneamente.

En un ejemplo, el primer par cognado de dominios variables se une al primer antígeno de interés, mientras que el segundo par cognado de dominios variable se une a un segundo antígeno de interés.

En una realización, un antígeno de interés unido por la molécula de anticuerpo o componente de cadena pesada/ligera del mismo puede ser una proteína asociada a célula, por ejemplo una proteína de superficie celular sobre células tales como células bacterianas, células de levadura, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés pueden ser también cualquier proteína médicamente relevante tal como aquellas proteínas reguladas positivamente durante enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus ligandos correspondientes. Los ejemplos particulares de proteínas de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas $\beta 1$, p.ej. VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, DPCR1, DPCR1, dudulina2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, similar a nectina 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC de clase I y MHC

de clase II y VEGF, y cuando sea apropiado receptores de las mismas.

Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos víricos, por ejemplo antígenos del virus respiratorio sincitial o citomegalovirus, inmunoglobulinas tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y, cuando sea apropiado, receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos de superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus tales como gripe, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionucleidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

10 En una realización, las moléculas de anticuerpo de la invención pueden usarse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.

En una realización, el antígeno de interés es seroalbúmina humana (HSA).

15 En una realización, el primer par cognado de dominios variables se une a OX40 y el segundo par cognado de dominios variables se une a seroalbúmina humana. En un ejemplo, la cadena pesada comprende la secuencia dada en la Figura 9 (SEQ ID NO:86) y la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:88.

20 Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente divulgación puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una sola molécula efectora o dos o más de tales moléculas ligadas de forma que formen un solo resto que puede enlazarse con los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo ligado con una molécula efectora, este puede prepararse mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante estándares en que el fragmento de anticuerpo se liga directamente o a través de un agente de acoplamiento con la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la materia (véanse Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, pág. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 25 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, la ligación puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describen en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

30 El término molécula efectora como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmento de anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p.ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que puedan detectarse por espectroscopía de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos incluyendo cualquier agente que sea perjudicial para células (p.ej. las mate). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras incluyen también, pero sin limitación, antimetabolitos (p.ej. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo-dacarbazina), agentes alquilantes (p.ej. mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiaminoplatino (II) (DDP), cisplatino), antraciclinas (p.ej. daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.ej., dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramina (AMC), caliceamicinas o duocarmicinas) y agentes antimetabólicos (p.ej. vincristina y vinblastina).

50 Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , bismuto 213 , californio 252 , iridio 192 y wolframio 188 /renio 188 , o fármacos tales como, pero sin limitación, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas y transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno de tejido, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, p.ej. angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), factor estimulante de colonias de

granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la patente de EE.UU. nº 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen Luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In y ⁹⁹Tc.

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como aquellos descritos en el documento WO05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero, en general puede ser un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, p.ej. un homopolisacárido o heteropolisacárido.

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

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

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

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

El tamaño del polímero puede variar como se desee, pero estará generalmente en el intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño de polímero puede seleccionarse en particular basándose en el uso pretendido del producto, por ejemplo la capacidad de localizarse en ciertos tejidos tales como tumores o de alargar la semivida en circulación (para revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones en que el producto permanece en circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

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

En un ejemplo, los anticuerpos para uso en la presente divulgación están enlazados con restos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden estar enlazadas a través de cualquier cadena lateral aminoacídica o grupo funcional aminoacídico terminal localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden aparecer naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden genomanipularse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véanse por ejemplo los documentos US 5.219.996; US 5.667.425; WO98/25971). En un ejemplo, se modifica la molécula de anticuerpo de la presente divulgación, en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir el enlazamiento de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína con los que puede enlazarse la molécula efectora. Pueden usarse múltiples sitios para enlazar dos o más moléculas de PEG.

En una realización, se liga una molécula de PEG con una cisteína 171 en la cadena ligera, por ejemplo véase el documento WO2008/038024. Adecuadamente, las moléculas de PEG están ligadas covalentemente a través de un

grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero enlazada con el fragmento de anticuerpo modificado puede estar covalentemente ligada al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el fragmento. La ligación covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace de azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de enlazamiento, pueden usarse moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidias y derivados de cisteína. Puede usarse un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero como se describe anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster α -halogenocarboxílico, p.ej. yodoacetamida, una imida, p.ej. maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20 K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

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

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

Los métodos generales mediante los que los vectores pueden construirse, métodos de transfección y métodos de cultivo son bien conocidos por los especialistas en la materia. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y al Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

La presente divulgación incluye también una célula hospedadora que comprende dicho vector y/o ADN.

Puede usarse cualquier sistema de célula hospedadora/vector adecuado para expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Pueden usarse también sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli* y otros microbianos, o sistemas de expresión de células hospedadoras eucarióticas, por ejemplo de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o hibridoma.

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

La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso tiene que usarse solo una secuencia de codificación de polipéptido de cadena pesada o cadena ligera para transfectar las células hospedadoras. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la estirpe celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa, puede usarse un solo vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

Los anticuerpos y fragmentos según la presente divulgación se expresan a buenos niveles a partir de células hospedadoras. Por tanto, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos están optimizadas y son favorables al procesamiento comercial.

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

Por tanto, se proporciona un anticuerpo o componente monocatenario del mismo para uso en tratamiento mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo. En una realización, el anticuerpo o componente monocatenario del mismo se administra en forma de una formulación farmacéutica.

Por tanto, la presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministrará habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación proporciona también un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico, o puede estar acompañada por otros ingredientes activos incluyendo otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo

anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-linfocitos T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

5 En una realización adicional, se emplea el anticuerpo, fragmento o composición según la divulgación en combinación con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista de beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y proliferación celulares (tales como rapamicina, ciclofosfamida, metotrexato) o como alternativa un inhibidor de CD28 y/o CD40. En una realización, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico de la diana.

10 Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente memoria hace referencia a la cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, puede estimarse inicialmente la cantidad terapéuticamente eficaz en ensayos en cultivo celular o en modelos animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal puede usarse también para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Tal información puede usarse entonces para determinar las dosis y vías de administración útiles en seres humanos.

15 La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá del estado patológico, de la salud general del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, la dieta, momento y frecuencia de administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse por experimentación rutinaria y está dentro del criterio del facultativo. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

20 Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (p.ej., simultánea, secuencial o separadamente) con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección para tratar, la extensión de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está usando profilácticamente o para tratar una afección existente.

25 La frecuencia de dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (p.ej. de 2 a 10 horas), puede ser necesario dar una o más dosis al día. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (p.ej. de 2 a 15 días), puede ser necesario dar solo una dosificación una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

30 El portador farmacéuticamente aceptable no debería inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales en el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoacídicos y partículas víricas inactivas.

35 Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácido mineral tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

40 Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales composiciones sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras del pH. Tales portadores posibilitan formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

45 Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, p.ej. por inyección o infusión, por ejemplo por inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, disolución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

50 Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos para tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones están adaptadas para administración a sujetos humanos.

Adecuadamente, en formulaciones según la presente divulgación, el pH de la formulación similar no es similar al

valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo si el pH de la formulación es 7, entonces puede ser apropiado un pl de 8-9 o superior. Aún sin desear limitarse por la teoría, se piensa que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo o fragmento permanece en disolución.

5 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante cualquier serie de vías incluyendo, pero sin limitación, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Pueden usarse también pistolas
10 inyectoras para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, en disoluciones o suspensiones líquidas. Pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección.

El suministro directo de las composiciones se logrará generalmente mediante inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o suministradas al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones pueden administrarse también a una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una sola dosis o un
15 programa de múltiples dosis.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición se va a administrar por una vía que use el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo de degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez se ha absorbido desde el tracto gastrointestinal.

20 Está disponible una discusión a fondo de los portadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una realización, se proporciona la formulación en forma de formulación para administraciones tópicas, incluyendo inhalación.

25 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles medidores que contienen gases propelentes o disoluciones inhalables exentas de gases propelentes. Los polvos inhalables según la divulgación que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas anteriormente mencionadas o en una mezcla de las sustancias activas anteriormente mencionadas con un excipiente fisiológicamente aceptable.

30 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (p.ej., glucosa o arabinosa), disacáridos (p.ej., lactosa, sacarosa, maltosa), oligosacáridos y polisacáridos (p.ej., dextranos), polialcoholes (p.ej. dextranos), polialcoholes (p.ej., sorbitol, manitol, xilitol), sales (p.ej., cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se usan adecuadamente monosacáridos o disacáridos, con el uso de lactosa o glucosa, particular pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

35 Las partículas para deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 10 micrómetros, tal como de 1-9 micrómetros, por ejemplo de 0,1 a 5 µm, en particular de 1 a 5 µm. El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de importancia primordial.

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

Son gases propelentes particularmente adecuados derivados de alcano halogenados seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados anteriormente mencionados, son particularmente adecuados G134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos.

45 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente pueden contener también otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizantes, agentes tensioactivos (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la materia.

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

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

El anticuerpo de la invención puede suministrarse dispersado en un disolvente, p.ej. en forma de una disolución o suspensión. Puede suspenderse en una disolución fisiológica apropiada, p.ej. solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una disolución tamponada. Las disoluciones tamponadas conocidas en la materia pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato de disodio, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para conseguir un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, anticuerpo liofilizado.

Las suspensiones o formulaciones en disolución terapéuticas pueden contener también uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la materia e incluyen tampones (p.ej., tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (p.ej. seroalbúmina), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las disoluciones o suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Estos pueden incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/disolución tamponado usado para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la disolución de disolvente tamponada estéril y la dispensación de la formulación en contenedores estériles mediante métodos familiares para los especialistas en la materia.

La formulación nebulizable según la presente divulgación puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de unidades de dosis única (p.ej. envases o viales de plástico sellados) empaquetados en envoltorios de lámina metálica. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen de, p.ej., 2 ml de disolvente /tampón de disolución.

Se piensa que los anticuerpos de la presente divulgación son adecuados para suministro mediante nebulización.

Comprender en el contexto de la presente memoria descriptiva pretende significar incluir.

Cuando sea técnicamente apropiado, pueden combinarse realizaciones de la invención.

Se describen realizaciones en la presente memoria que comprenden ciertos rasgos/elementos. La divulgación se extiende también a realizaciones separadas que consisten o consisten esencialmente en dichos rasgos/elementos.

La presente invención se describe además solo a modo de ilustración en los siguientes ejemplos, que hacen referencia a las Figuras acompañantes.

Ejemplos

Generación del anticuerpo (FabFv)₂Fc

Se generó (FabFv)₂Fc (Figura 3D) mediante el método de PCR de superposición que ligaba una región de codificación de A26 gH2 Fab 2G4S 645 gH1 existente con Fc de gamma 1 (véanse las Figuras 4 y 5). El empalme es el final de 645 gH1 y la bisagra inferior de Fc de g1. Se clonó la región de codificación anterior en el vector de expresión de mamífero UCB estándar bajo el control del promotor HCMV-MIE y poliA de SV40E. Se emparejó el ADN con un plásmido similar que codifica la correspondiente cadena ligera (A26 gL8 CK 2G4S 645 gL1, véanse las figuras 6 y 7) y se usó para transfectar células HEK293 en discos de 6 pocillos. Se usó 293fectin de Invitrogen para transfectar las células y se incubaron entonces las células durante 6 días en una plataforma agitada a 37 °C. Se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificó la cantidad de anticuerpo secretado por ELISA. Se sometieron entonces los sobrenadantes a análisis BIAcore. Se muestran las secuencias del anticuerpo en las Figuras 4-7.

Ensayo BIAcore

El A26Fab es específico de OX40 y 645Fv tiene especificidad por seroalbúmina humana (HSA). El 645 se ha descrito anteriormente en el documento WO2009040562.

Se determinaron las afinidades de unión y parámetros cinéticos para la interacción de (A26Fab-645Fv)₂-Fc (con el formato mostrado en la Figura 3D) con HSA (Jackson ImmunoResearch, 009-000-051) y hOX40 (AnceCell 513-020) mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) realizada en un BIAcore 3000 usando chips sensores CM5 y tampón de migración HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005 % v/v de tensioactivo P20). Se capturaron las muestras de (A26Fab-645Fv)₂-Fc en la superficie del chip sensor usando un anticuerpo monoclonal de cabra específico de Fc humano F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, 109-006-098) o anti-CH1 humano generado en laboratorio. Se consiguió la inmovilización covalente del anticuerpo de captura mediante química de acoplamiento de amina estándar.

Cada ciclo de ensayo consistía en capturar en primer lugar (A26Fab-645Fv)₂-Fc usando una inyección de 1 min, antes de una fase de asociación consistente en una inyección de 3 min de antígeno, después de lo cual se monitorizaba la disociación durante 10 min. Después de cada ciclo, se regeneraba la superficie de captura con 2 inyecciones de 1 min de HCl 40 mM seguidas de 30 s de NaOH 5 mM. Los caudales usados eran 10 µl/min para captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación y 10 µl/min para regeneración.

Se practicaron las titulaciones de seroalbúmina humana a concentraciones de 500, 250, 125 y 62,5 μM . Se usó una celda de flujo en blanco para sustracción de referencia y se incluyeron inyecciones en blanco de tampón para sustraer el ruido y deriva del instrumento.

5 Se determinaron los parámetros cinéticos mediante ajuste global simultáneo de los sensorgramas resultantes a un modelo de unión 1:1 estándar usando el software BiaEvaluation v3.2.

Para probar la unión simultánea de antígenos a $(\text{A26Fab-645Fv})_2\text{-Fc}$, se inyectaron inyecciones de 3 min de HSA 2 μM o hOX40 50 nM separadas o una disolución mixta de HSA 2 μM y OX40 50 nM sobre la muestra capturada.

Resultados

10 Se realizó el análisis de unión cinética por SPR para valorar las interacciones de seroalbúmina humana (HSA) con la fusión $(\text{A26Fab-645Fv})_2\text{-Fc}$, cuando se captura usando anticuerpo anti-Fc o anti-CH1. Los parámetros cinéticos para la unión de HSA no se afectaban significativamente por el método de captura diferente (Tabla A).

15 Se valoró el potencial de la construcción $(\text{A26Fab-645Fv})_2\text{-Fc}$ de unirse simultáneamente tanto a seroalbúmina humana como a OX40 humana capturando $(\text{A26Fab-645Fv})_2\text{-Fc}$ en la superficie del chip sensor, antes de practicar inyecciones de 3 min separadas de HSA 2 μM u OX40 humano 50 nM, o una disolución mixta tanto de HSA 2 μM como OX40 50 nM. Se consiguió la captura usando un anticuerpo anti-Fc o anti-CH1. Para cada método de captura, la respuesta vista para la disolución combinada de HSA/OX40 era casi idéntica a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes (Tabla B). Esto muestra que $(\text{A26Fab-645Fv})_2\text{-Fc}$ es capaz de unirse simultáneamente tanto a HSA como a OX40, permaneciendo la porción de Fc de la fusión accesible para la unión.

20 **Tabla A** Afinidad y parámetros cinéticos determinados para la unión de HSA a $(\text{A26-645Fv})_2\text{-Fc}$ capturado usando anticuerpo anti-Fc o anti-CH1.

| Construcción | Captura | ka (x104M-1s-1) | kd (x10-5s-1) | KD (x10-9M) |
|-----------------------------------|----------|-----------------|---------------|-------------|
| (A26-645Fv)₂-Fc | anti-CH1 | 6,2 | 6,00 | 0,97 |
| (A26-645Fv)₂-Fc | anti-Fc | 3,8 | 7,14 | 1,88 |

Tabla B Respuesta de unión (UR) vista después de inyecciones separadas de HSA o OX40, o inyección de HSA y OX40 premezclados. En cada caso, la concentración final era de albúmina HSA 2 μM y OX40 50 nM. Se indica el anticuerpo de captura usado. Se muestra entre paréntesis la suma de las respuestas de HSA y OX40 individuales.

| Construcción | Anticuerpo de captura | Analito | Unión (UR) | |
|--------------------------------------|-----------------------|------------|------------|---------|
| (A26Fab-645Fv)₂-Fc | anti-CH1 | HSA | 106,7 | |
| | | OX40 | 74,2 | |
| | | HSA + OX40 | 179,6 | (180,9) |
| (A26Fab-645Fv)₂-Fc | anti-Fc | HSA | 65,8 | |
| | | OX40 | 54,6 | |
| | | HSA + OX40 | 118,4 | (120,4) |

25

La Tabla C y D siguientes proporcionan datos de BIAcore comparativos para diferentes construcciones

Tabla C Resumen de la unión de HSA a las fusiones A26 Fab-645-Fv e IgG-645-Fv

| Construcción | Albúmina | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (nM) | Estequiometría |
|--------------------------------------|----------|-----------|----------|---------|----------------|
| A26-Fab-645-Fv | HSA | 1,68E+04 | 1,16E-04 | 6,92 | 0,71 |
| A26-Fab | HSA | Sin unión | | | |
| (A26Fab-645Fv)₂-Fc | HSA | 6,21E+04 | 6,00E-05 | 0,97 | 0,55 |
| A26-IgG | HSA | Sin unión | | | |

Tabla D Unión dual a HSA y hOX40 (HSA a 2 uM, hOX40 a 50 nM)

| Construcción | Analito | Respuesta corregida por tampón | Respuesta de OX40 + HSA |
|--------------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------|
| A26-Fab | HSA | 5,84 | |
| | hOX40 | 99,02 | |
| | HSA + hOX40 | 103,1 | 104,86 |
| A26-Fab-645-Fv | HSA | 106,65 | |
| | hOX40 | 74,23 | |
| | HSA + hOX40 | 179,55 | 180,88 |
| A26-IgG | HSA | 3,12 | |
| | hOX40 | 97,91 | |
| | HSA + hOX40 | 101,68 | 101,03 |
| (A26Fab-645Fv)₂-Fc | HSA | 107,6 | |
| | hOX40 | 79,54 | |
| | HSA + hOX40 | 186,19 | 187,14 |

5 PAGE-SDS

Se añadieron a 26 µl de muestra 10 µl de tampón de disociación de dodecilsulfato de litio 4X, para las muestras no reducidas 4 µl de N-etilmaleimida 100 mM y para las muestras reducidas 4 µl de tampón reductor 10X. Se agitaron con vórtex las muestras, se incubaron a 100 °C durante 3 min, se enfriaron y se centrifugaron a 16000xg durante 30 s. Se cargaron 15 µl de las muestras preparadas en geles de acrilamina al 4-20 % con Tris/glicina-SDS y se hicieron migrar durante 100 min a 125 V, voltaje constante. Se tiñeron los geles con tinte de proteína azul de Coomassie y se destiñeron con ácido acético al 7,5 %.

Los resultados se muestran en la Figura 8. La Figura 8 muestra un gel de poliacrilamida al 4-20 % teñido con azul de Coomassie. Todas las muestras se han hecho migrar en condiciones no reductoras (mitad izquierda del gel) y reductoras (mitad derecha del gel). Los 4 carriles marcados gA26IgG eran sobrenadantes celulares de mamífero que expresaban IgG completa. En condiciones no reductoras, hay una banda principal a ~200 kDa que es el anticuerpo completo que comprende dos cadenas pesadas (vH1-CH1-CH2-CH3) y dos cadenas ligeras (vK-CK) ligadas por enlaces disulfuro. En condiciones reductoras, hay 2 bandas principales, una a ~55 kDa que es la cadena pesada y otra a ~30 kDa que es la cadena ligera. Los 2 carriles marcados gA26Fab-Fv645 eran sobrenadantes celulares de

mamífero que expresaban Fab-Fv. En condiciones no reductoras, hay una banda principal a ~100 kDa que es el Fab-Fv completo que comprende dos cadenas de tamaño aproximadamente igual, una cadena pesada (vH1-CH1-vH2) y una cadena ligera (vK1-CK-vK2) ligadas por enlaces disulfuro. En condiciones reductoras, hay una banda principal a ~40 kDa que es tanto la cadena pesada (vH1-CH1-vH2) como la cadena ligera (vK1-CK-vK2).

5 Los 2 carriles marcados (gA26Fab-Fv645)₂-Fc eran sobrenadantes celulares de mamífero que contenían (Fab-Fv)₂-Fc expresada. En condiciones no reductoras, hay una banda principal a >200 kDa que es el (Fab-Fv)₂-Fc completo que comprende dos cadenas pesadas (vH1-CH1-vH2-CH2-CH3) y dos cadenas ligeras (vK1-CK-vK2) ligadas por enlaces disulfuro. En condiciones reductoras, hay dos bandas principales, una está a ~65 kDa, que es la cadena pesada (vH1-CH1-vH2-CH2-CH3) y otra está a ~40 kDa, que es la cadena ligera (vK1-CK-vK2). La mayoría de las
10 demás bandas son proteínas de sobrenadante irrelevantes que son equivalentes entre las muestras. El patrón de bandas observado para (gA26Fab-Fv645)₂-Fc es como se esperaba cuando se compara con el patrón de bandas observado para los controles de IgG y Fab-Fv. Todas las construcciones se expresaban bien. La intensidad de banda sugiere que IgG y Fab-Fv se expresaban a niveles similares, mientras que (Fab-Fv)₂-Fc se expresaba a un nivel menor.

15 **Listado de secuencias**

<110> UCB Pharma S.A.
Adams, Ralph
Dave, Emma
20 Humphreys, David

<120> Anticuerpos multivalentes

<130> G0102-WO01

25 <150> US 61/241.159
<151> 10-09-2009

<160> 89

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 8
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de bisagra

40 <400> 1

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
1 5

45 <210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Secuencia de bisagra

<400> 2

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

60 <210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 667 258 T3

<400> 7

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

5 <210> 8
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de bisagra

<400> 8

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

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

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de bisagra

25 <400> 9

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

30 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223>Ligante

<400> 10

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

40 <210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223>Ligante

<400> 11

50 Asp Lys Thr His Thr Ser
1 5

<210> 12
<211> 6
55 <212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223>Ligante

<400> 12
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

5 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223>Ligante

15 <400> 13
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

20 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223>Ligante

<400> 14
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

30 <210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223>Ligante

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

40 Gly Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 16
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223>Ligante

50 <400> 16
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

ES 2 667 258 T3

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223>Ligante
 <400> 17
 10
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223>Ligante
 20
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 25
 <400> 18
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 30
 <210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223>Ligante
 <220>
 <221> característica_misc
 40
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica_misc
 45
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 19
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Ala Ser
 50 20
 <210> 20
 <211> 26
 <212> PRT
 55
 <213> Artificial
 <220>
 <223>Ligante
 <220>

<221> característica_misc
 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12) .. (12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (17) .. (17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 15
 <400> 20
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

 Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 20 <210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223>Ligante
 <220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica_misc
 35 <222> (12) .. (12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica_misc
 40 <222> (17) .. (17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (22) .. (22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 21
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 50 20 25 30
 <210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 55 <213> Artificial
 <220>

ES 2 667 258 T3

<223>Ligante

<220>
 <221> característica_misc
 5 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 28
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

<220>
 <223>Ligante

20 <400> 23

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

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

<210> 24
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 30 <223>Ligante

<400> 24

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

35 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223>Ligante

<400> 25

45 Ala Thr Thr Thr Gly Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 21
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223>Ligante

55 <400> 26

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

ES 2 667 258 T3

Ser His Lys Ser Pro
20

<210> 27
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223>Ligante
10 <400> 27

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

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

20 <220>
<223>Ligante
<400> 28

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

25 <210> 29
<211> 15
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223>Ligante

35 <400> 29

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

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

<220>
45 <223>Ligante
<400> 30

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

50 <210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223>Ligante
<400> 31

60

ES 2 667 258 T3

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

<210> 32
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223>Ligante
 10 <400> 32

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

15 <210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223>Ligante
 <400> 33

Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 25 1 5 10

<210> 34
 <211> 18
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223>Ligante

35 <400> 34

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

Arg Pro

40 <210> 35
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 45 <223>Ligante
 <400> 35

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

50 Thr Thr

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

55 <220>

ES 2 667 258 T3

<223>Ligante

<400> 36

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

5 Phe Asn

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223>Ligante

15 <400> 37

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

Pro Ala

<210> 38

20 <211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223>Ligante

<400> 38

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

Arg Thr

30

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223>Ligante

<400> 39

40

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

Phe Gly

<210> 40

<211> 18

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223>Ligante

50

<400> 40

ES 2 667 258 T3

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

Gly Ala

5 <210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223>Ligante

<400> 41

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

Asp Leu

15 <210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223>Ligante

<400> 42

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

Ser Leu

30 <210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223>Ligante

<400> 43

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

Ile Ser

40 <210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223>Ligante

<400> 44

ES 2 667 258 T3

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

Pro

<210> 45
 <211> 18
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223>Ligante

10 <400> 45

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

Pro Pro

15 <210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223>Ligante

<400> 46

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

25 Pro Tyr

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223>Ligante

35 <400> 47

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

Pro

40 <210> 48
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223>Ligante

<400> 48

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

ES 2 667 258 T3

Leu Arg

5 <210> 49
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223>Ligante
 <400> 49

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

Phe Pro

15 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina
 <400> 50

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

30 <210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

35 <400> 51

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

40 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina
 <400> 52

50 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Gly Asp
 1 5 10 15

55 <210> 53
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina
 <400> 53

ES 2 667 258 T3

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Glu Asp Asp Glu
 20

5 <210> 54
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

<400> 54

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Arg Ser Val
 20

15 <210> 55
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

<400> 55

25 Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Arg Ser Val Lys
 20

30 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

<400> 56

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
 1 5 10 15

40 <210> 57
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

<400> 57

ES 2 667 258 T3

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

Asp Asp

<210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

10

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

20

<400> 59

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

<210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

30

<400> 60

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

Asp Asp

<210> 61
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

45

<400> 61

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

Pro Leu Arg Gly
 20

50

<210> 62
 <211> 20

ES 2 667 258 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 62

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

 Arg Ser Glu Gln
 20
 10
 <210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

 <400> 63
 20
 Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met
 1 5 10

 <210> 64
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223>Ligante
 30
 <400> 64

 Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
 1 5 10
 35 <210> 65
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223>Ligante

 <400> 65

 Pro Pro Pro Pro
 45 1

 <210> 66
 <211> 2089
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> A26gH2 gamma1-CH1 2GS 645gH1 Fc de gamma1
 55 <400> 66

ES 2 667 258 T3

gagggtgcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc
60

tcttgtgcag caagcgggtt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca
120

ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac
180

cgtgactctg tcaaaggtcg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac
240

ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt
. 300

gaaggtatct tcgactactg gggtcagggc accctggtaa ctgtctcgag cgcttctacc
360

aaaggtccga gcgttttccc actggctcgc agctctaaat ccacctctgg tggtaaggct
420

ES 2 667 258 T3

gcactggggtt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct
480

ggtgcaactga cctctgggtg tcacaccttt ccagcagttc tgcagtcttc tggctctgtac
540

tccctgtcta gcgtgggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc
600

aacgtcaacc acaaaccgtc caacacgaaa gtggacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt
660

tccggagggtg gcggttctgg tggcgggtgga tccgaggttc agctgctgga gtctggaggc
720

gggcttgtcc agcctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagtaagcgg catcgacctg
780

tccaactacg cgattaactg ggtacgtcag gcaccgggta aaggtctgga atggatcggc
840

atcatctggg cctctgggtac gaccttctac gctacttggg ccaaaggteg tttcaccato
900

tcccgtgact ctaccaccgt gtacctgcag atgaactctc tgcgtgcgga agacactgcg
960

gtttactatt gcgcgcgtac cgttccgggc tattctactg cacctactt cgacctgtgg
1020

ggtcagggta ctctgggttac cgtctcgtct gacaaaacto acacatgccc accgtgcccc
1080

ggtaagccag cccaggctc gccctccagc tcaaggcggg acagggtgcc tagagtagcc
1140

tqcatccagg qacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct ctctctcagc
1200

acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct
1260

catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc
1320

tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc
1380

gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcttgcacca
1440

ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc acaaaagccc tcccagcccc
1500

catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccctg ggggtgagag ggccacatgg
1560

acagaggccg gctcggccca ccctctgccc tgagagtgac cgtgtacca acctctgtcc
1620

ES 2 667 258 T3

ctacagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga
1680

ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccage gacatcgccg
1740

tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg
1800

actccgacgg ctcccttctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc
1860

aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga
1920

agagcctctc cctgtctccg ggtaaagtag tgcgacggcc ggcaagcccc cgtccccgg
1980

gctctcgagg tcgcaagagg atgcttgcca cgtaccccct gtacatactt cccgggccc
2040

cagcatggaa ataaagcacc cagcgtgcc ctgggcccag ctggaattc
2089

- 5 <210> 67
- <211> 351
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> A26gH2

<400> 67

gagggtcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
60

tcttgtgcag caagcggttt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca
120

ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac
180

cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgat acgcgaaaaa ctctccgtac
240

ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactgggtgt
300

gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag c
351

- 15 <210> 68
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> A26 gH2

<400> 68

ES 2 667 258 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 69
- <211> 309
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> CH1 de gamma 1

<400> 69

gcttctacca aaggctcgag cgttttccca ctggctccga gctctaaatc cacctctggt
 60

ggtacggctg cactgggttg cctgggtgaaa gactacttcc cagaaccagt tacctgtgtt
 120

tggaactctg ggcactgac ctctggtgtt cacaccttcc cagcagttct gcagtcttct
 180

ggtctgtact cctgtctag cgtgggtacc gttccgtctt cttctctggg tactcagacc
 240

tacatctgca acgtcaacca caaacctcc aacacgaaag tggacaaaaa agtcgagccg
 300

aaatcctgt
 309

- 15 <210> 70
- <211> 103
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> CH1 de gamma 1

<400> 70

ES 2 667 258 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100

5 <210> 71
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ligante 2G4S
 <400> 71

tccggagggtg gcggttctgg tggcgggtgga tcc
 33

15 <210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Ligante 2G4S
 <400> 72

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

30 <210> 73
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> 645 gH1

35 <400> 73

ES 2 667 258 T3

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg ctgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgca ttaactgggt acgtcaggca
120

ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcacc atctgggect ctggtagcgc ctctacgct
180

acttgggcca aaggctggtt caccatctcc cgtgactcta ccaccgtgta cctgcagatg
240

aactctctgc gtgcggaaga cactgcggtt tactattgag cgcgtaccgt tccgggctat
300

tctactgcac cgtacttcga cctgtgggggt cagggtactc tggttaccgt ctctct
357

<210> 74

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 645 gH1

10

<400> 74

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

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

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

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

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

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

15

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75

<211> 899

20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Fc de gamma1 (bisagra CH2CH3)

25

<400> 75

ES 2 667 258 T3

gacaaaactc acacatgccc accgtgccc a ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc
60

tcaaggcggg acaggtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc
120

tgacacgtcc acctccatct ctctctcagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt
180

cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtccacatg
240

cgtggtgggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg
300

cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg
360

tgtggtcagc gtctccaccg tctctcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg
420

caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acctcttcca aagccaaagg
480

tgggaccctg ggggtgcgag ggccacatgg acagaggccg gctcggccca ccctctgcc
540

tgagagtgac cgtcttacca acctctgtcc ctacaggga gccccgagaa ccacaggtgt
600

acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtagcctg acctgcctgg
660

tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga
720

acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca
780

agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt ctctctatgc tccgtgatgc
840

atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga
899

- 5 <210> 76
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Fc de gamma 1 (bisagra CH2 CH3)

<400> 76

ES 2 667 258 T3

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

- 5 <210> 77
- <211> 1047
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> A26gL8 cK 2G4S 645gL1 marcaje c-myc

<400> 77

ES 2 667 258 T3

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tegtgtgact
60

attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg
120

ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct
180

cgtttctctg cgtctggttc tggtaaggac tctactctga ccactcctc tctgcagccg
240

gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgg
300

ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg
360

tctgacgaac agctcaaactc tggtaactgct tctgtcgttt gcctcctgaa caactctat
420

ccgcgtgaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag
480

gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact
540

ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccactcagggt
600

ctgagctctc cggttaccaa aagctttaat agaggggagt gttccggagg cgggtgctct
660

ggtggcggtg gatccgatat cgtgatgacc cagagtccaa gcagtgttcc cgccagccta
720

ggcgatcgtg tgactattac ctgtcagtec tctccgagcg tttggtccaa cttcctgagc
780

tggtaaccagc agaaaccggg taaagccccg aaactgctga tctacgaggc gtctaaactg
840

acctctggcg tacctgcccg tttcaaagge tctggctctg gtacggactt cactctgacc
900

atctcctctc tgcagccgga agactttgca acgtactact gcgggtggtg ttactcttcc
960

atctctgaca ccacgttcgg tggtygcacc aaagttgaaa tcaaactgat gcatgaacaa
1020

aaactcatct cagaagagga tctgtaa
1047

- 5 <210> 78
<211> 321
<212> ADN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> A26 gL8
- <400> 78

ES 2 667 258 T3

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgccg gcgtaggcga tegtgtgact
60

attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggatatca gcagaaaccg
120

ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct
180

cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccactctctc tctgcagccg
240

gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt
300

ggtaccaaag ttgagatcaa a
321

<210> 79
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> A26 gL8

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

15 <210> 80
<211> 321
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> cKappa

25 <400> 80

ES 2 667 258 T3

cgtagcggttg cagctccatc cgtcttcac c ttccaccgt ctgacgaaca gctcaaactc
60

ggtagctgctt ctgtcgtttg cctcctgaac aactttctatc cgcgtgaagc gaaagtccag
120

tggaaagtcg acaacgcact ccagctcgtt aactctcagg aatctgtgac cgaacaggac
180

tccaaagact ccacctactc tctgtctagc acctgactc tgtccaaagc agactacgag
240

aaacacaaag tgtacgcttg cgaagttacc catcagggtc tgagctctcc ggttaccaaa
300

agctttaata gaggggagtg t
321

<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> cKappa

10

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

15 <210> 82
<211> 333
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> 645 gL1

<400> 82

ES 2 667 258 T3

gatatcgtga tgaccagag tccaagcagt gttccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact
60

attacctgtc agtctctcc gagcgtttg tccaacttcc tgagctggta ccagcagaaa
120

ccgggtaaag ccccgaaact gctgatctac gaggcgtcta aactgacctc tgggtaccg
180

tcccgtttca aaggtcttg ctctggtaag gacttcactc tgaccatctc ctctctgcag
240

ccggaagact ttgcaacgta ctactgcggt ggtggttact ctccatctc tgacaccag
300

ttcggtggtg gcaccaaagt tgaaatcaaa cgt
333

<210> 83
<211> 111
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> 645 gL1

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

15 <210> 84
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Marcaje Myc

<400> 84

25 atgcatgaac aaaaactcat ctcaagaag gatctg
36

ES 2 667 258 T3

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> Marcaje Myc

<400> 85
10
Met His Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 86
<211> 577
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A26gH2 gamma1-CH1 2GS 645gH1 Fc de gamma1
20
<400> 86

ES 2 667 258 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 667 258 T3

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

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

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
 245 250 255

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 260 265 270

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr
 275 280 285

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr
 325 330 335

Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Lys
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

ES 2 667 258 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 87
 <211> 217
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fc de gamma1 (CH2CH3)

10

<400> 87

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

ES 2 667 258 T3

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> 88
<211> 336
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> A26gL8 C2G4S 645gL1 (sin marcaje myc)

<400> 88

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 667 258 T3

| | | |
|--|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
| Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala 50 55 60 | | |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80 | | |
| Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu 85 90 95 | | |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 100 105 110 | | |
| Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 115 120 125 | | |
| Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala 130 135 140 | | |
| Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 145 150 155 160 | | |
| Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165 170 175 | | |
| Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr 180 185 190 | | |
| Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195 200 205 | | |
| Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 210 215 220 | | |
| Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val 225 230 235 240 | | |
| Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser 245 250 255 | | |
| Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu 260 265 270 | | |
| <hr/> | | |
| Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe 275 280 285 | | |
| Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu 290 295 300 | | |
| Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser 305 310 315 320 | | |
| Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 325 330 335 | | |

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada del mismo que comprende:
una cadena pesada que comprende un fragmento de región constante,
- 5 estando localizado dicho fragmento de región constante entre dos dominios variables que no son un par cognado, comprendiendo además la cadena pesada una región Fc con al menos un dominio seleccionado de CH2, CH3 y combinaciones de los mismos, con la condición de que la cadena pesada no contenga más de un dominio CH1 y contenga solo dos dominios variables, y
- 10 una cadena ligera que comprende un fragmento de región constante localizado entre dos dominios variables que no son un par cognado, en el que dichas cadenas pesada y ligera están alineadas para proporcionar un primer sitio de unión formado por un primer par cognado de dominios variables y un segundo sitio de unión formado por un segundo par cognado de dominios variables; y en el que el anticuerpo recombinante es biespecífico, y
- 15 en el que el fragmento de región constante de la cadena pesada consiste en un dominio CH1 o un dominio CL con la condición de que cuando el fragmento de región constante en la cadena pesada sea un dominio CH1, el fragmento de región constante en la cadena ligera consista en un dominio CL, y cuando el fragmento de región constante de la cadena pesada sea un dominio CL, el fragmento de región constante de la cadena ligera consista en un dominio CH1.
- 20 2. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según la reivindicación 1, en el que el fragmento de región constante de la cadena pesada es un dominio CH1 y el fragmento de región constante de la cadena ligera es un dominio CL.
3. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada y cadena ligera asociado al mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que:
- 25 a) el fragmento de región constante de cadena pesada está fusionado con el dominio VH del primer par cognado,
b) el fragmento de región constante de cadena ligera está fusionado con el VL del primer par cognado,
4. Un anticuerpo recombinante o un componente de cadena pesada y cadena ligera asociado al mismo según la reivindicación 3, en el que:
- 30 a) el fragmento de región constante de cadena pesada está ligado a través de un péptido con el dominio VH del segundo par cognado,
b) el fragmento de región constante de cadena ligera está ligado a través de un ligante con el VL del segundo par cognado,
5. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los dominios variables de al menos un par cognado están ligados por un enlace disulfuro.
- 35 6. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según la reivindicación 5, en que el segundo par cognado que forma el segundo sitio de unión está ligado por un enlace disulfuro.
7. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento de región constante de la cadena pesada está ligado al fragmento de región constante de la cadena ligera por un enlace disulfuro.
- 40 8. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fragmento de región constante de la cadena pesada consiste en CH1.
9. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el fragmento de región constante de la cadena ligera consiste en cKappa.
- 45 10. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según la reivindicación 4, en el que el ligante peptídico es un péptido de unión a albúmina.
11. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según la reivindicación 4, en el que el ligante peptídico es la secuencia dada en la SEQ ID NO: 72.

12. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la región Fc comprende además una bisagra.
- 5 13. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en que cada dominio variable en la cadena pesada es un VH y cada dominio variable en la cadena ligera es un VL.
14. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en que los dominios variables están humanizados.
- 10 15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.
16. Un anticuerpo recombinante o una cadena pesada y cadena ligera asociada al mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición farmacéutica según la reivindicación 15 para uso en tratamiento.

Figura 1

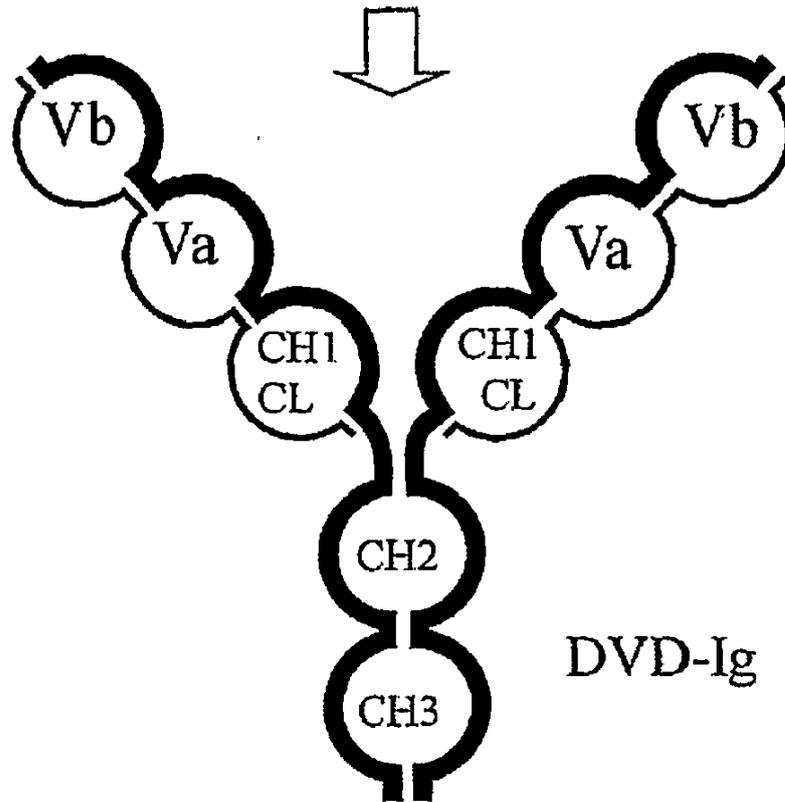
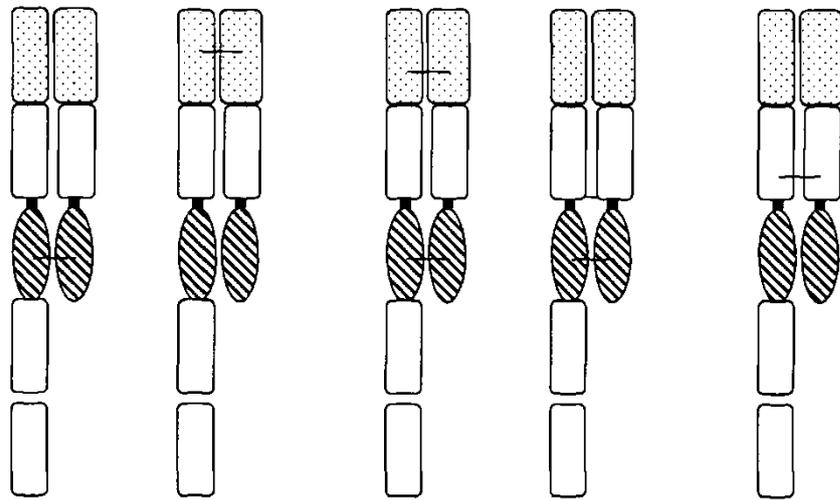


Figura 2



Dominio variable del primer par cognado 
 Regiones constantes de cadena pesada 

CL 

Dominio variable del segundo par cognado 

Ligador peptídico 

Enlace disulfuro 

Figura 3A

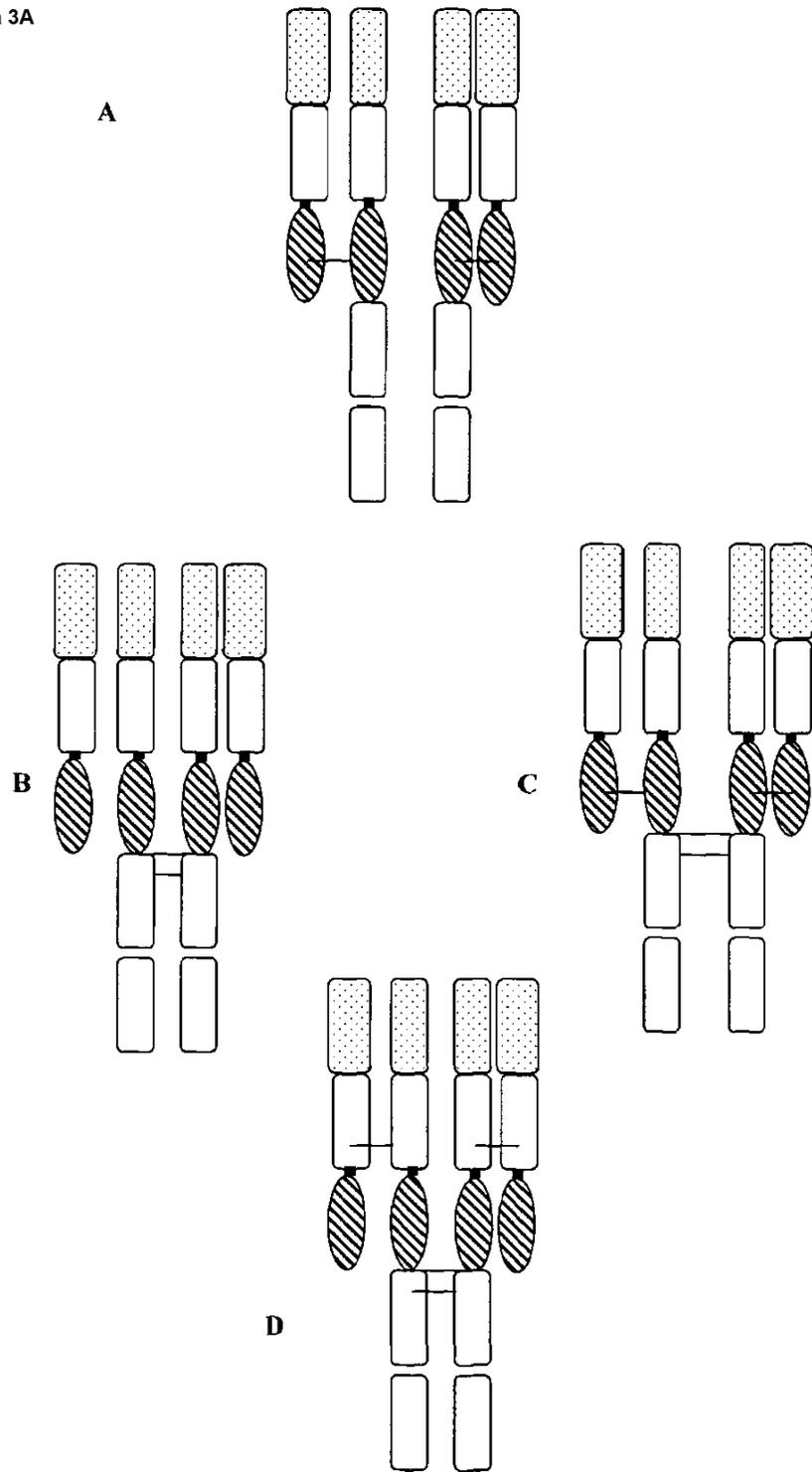


Figura 3B

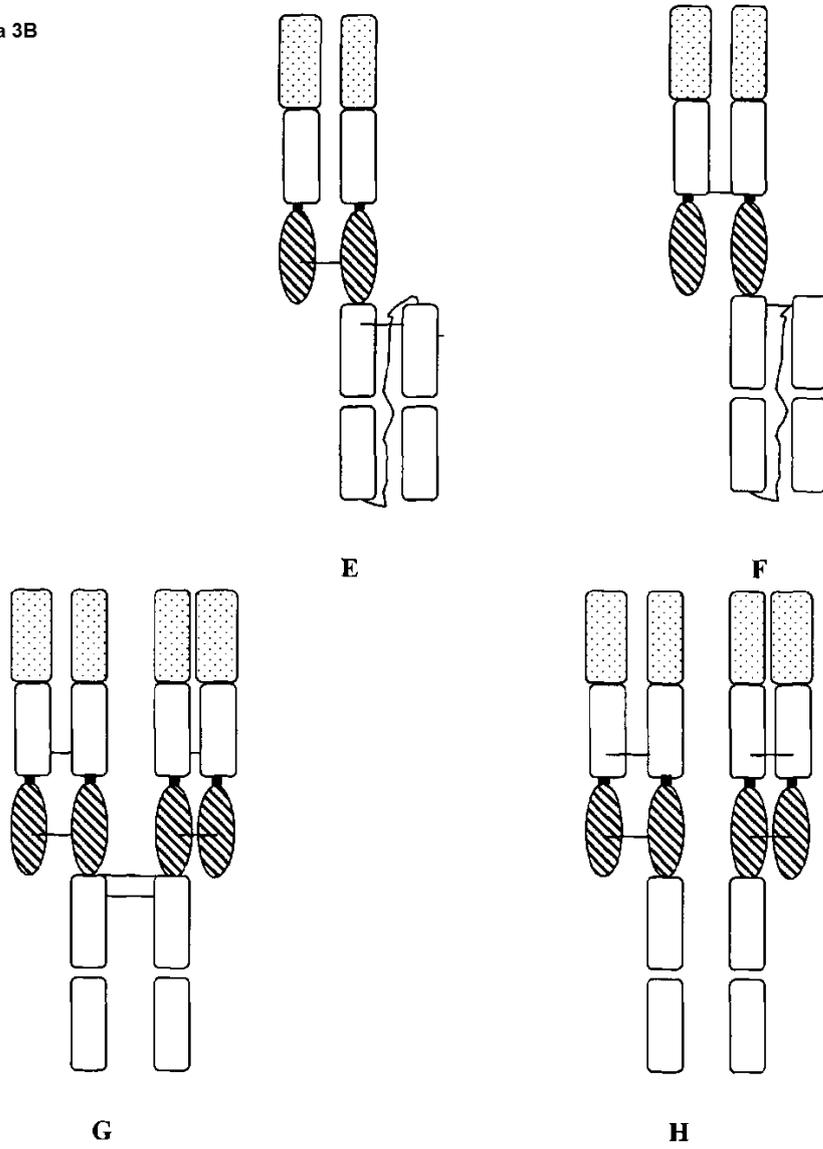


Figura 4

Cadena pesada (SEQ ID NO:66)

Secuencia de codificación de (A26 gH2 gamma 1-CH1 2G4S 645 gH1)₂ Fc de gamma 1
gaggtgcagctggtcgagctcggaggcgggcttgtccagcctggagggagcctgcgtctctc
ttgtgcagcaagcggtttcacgttcaccaactacgggtatccactggattcgtcaggcaccag
gtaaaggtctggaatgggtagcctctatctctccgtctggtggtctgacgtactaccgtgac
tctgtcaaaggtcgtttcaccatctctcgtgatgacgcgaaaaactctccgtacctgcagat
gaactctctgcgtgcagaagataccgcagtgactactgcgctactgggtggtgaaggtatct
tcgactactggggtcagggtagcctggtaactgtctcgagcgtctctaccaaggtccgagc
gttttcccactggctccgagctctaaatccacctctgggtggtacggctgcactgggttgct
gggtgaaagactacttcccagaaccagttaccgtgtcttggaaactctgggtgcactgacctctg
gtgttcacaccttccagcagttctgcagctctctgggtctgtactccctgtctagcgtggtt
accgttccgtctctctctctgggtactcagacctacatctgcaacgtcaaccacaaaccgtc
caacacgaaaagtggacaaaaaagtgcagccgaaatcctgttccggaggtggcggttctgggtg
gcgggtggatccgaggttcagctgctggagctcggaggcgggcttgtccagcctggagggagc
ctgcgtctctctgtgcagtaagcggcatcgacctgtccaactacgcgattaactgggtacg
tcaggcaccgggtaaaaggtctggaatggatcggcatcatctgggectctggtacgacctct
acgctacttgggccaaggtcgtttcaccatctcccgtgactctaccaccgtgtacctgcag
atgaactctctgcgtgcggaagacactgcgggttactattgcgcgcgtaaccgttccgggcta
ttctactgcaccgtacttcgacctgtggggtcagggtagctctgggtaccgtctcgtctgaca
aaactcacacatgccaccgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaagg
cgggacaggtgccctagagtagcctgcatccagggacaggcccagccgggtgctgacacgt
ccacctccatctctcctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctcctcttcccc
ccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgga
cgtgagccacgaagacctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata
atgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagc
cctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggtgggaccctgggggtgcgag
ggccacatggacagaggccggctcggcccacctctgcctgagagtgaccgtgtaccaac
ctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatg
agetgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggctctatcccagcgacatc
gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgct
ggactccgacggctcctctctcctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagc
aggggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaag
agcctctccctgtctccgggtaaatgagtgcgacggccggcaagccccgctccccgggctc
tcgcggtcgcacgaggatgcttggcacgtacccctgtacatacttcccgggcgcccagcat
ggaataaaagcaccagcgtgcctgggcccagctcgaattc

La secuencia anterior está compuesta por lo siguiente:

A26 gH2

Gaggtgcagctggtcgagctcggaggcgggcttgtccagcctggagggagcctgcgtctctc
ttgtgcagcaagcggtttcacgttcaccaactacgggtatccactggattcgtcaggcaccag
gtaaaggtctggaatgggtagcctctatctctccgtctggtggtctgacgtactaccgtgac
tctgtcaaaggtcgtttcaccatctctcgtgatgacgcgaaaaactctccgtacctgcagat
gaactctctgcgtgcagaagataccgcagtgactactgcgctactgggtggtgaaggtatct
tcgactactggggtcagggtagcctggtaactgtctcgagc (SEQ ID NO:67)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDR
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLR AEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS(SEQ ID
NO:68)-

Figura 5

CH1 de gamma1

Gcttctaccaaaggtccgagcgttttcccactggctccgagctctaaatccacctctggtgg
 tacggctgcaactgggttgctgggtgaaagactacttcccagaaccagttaccgtgtcttgg
 actctgggtgcaactgacctctgggtgttcacaccttccagcagttctgcagttctctggtctg
 tactccctgtctagcgtgggttaccgttccgtcttcttctctgggtactcagacctacatctg
 caacgtcaaccacaaaccgtccaacacgaaagtggacaaaaaagtccgagccgaaatcctgt

(SEQ ID NO:69)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YLSLVVTVFPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC **(SEQ ID NO:70)**

2(G4S)

tccggaggtggcgggttctggtggcgggtggatcc **(SEQ ID NO:71)**

SGGGSGGGGS **(SEQ ID NO:72)**

645 gH1

Gaggttcagctgctggagtctggaggcgggcttgtccagcctggagggagcctgcgtctctc
 ttgtgcagtaagcggcatcgacctgtccaactacgcgattaactgggtacgtcaggcaccgg
 gtaaaggtctggaatggatcggcatcatctgggcctctggtacgacctctacgctacttgg
 gccaaaggtcgtttcaccatctcccgtgactctaccaccgtgtacctgcagatgaactctct
 gcgtgcggaagacactgcggttactattgcgcgcgtaccgttccgggctattctactgcac
 cgtacttcgacctgtgggggtcagggtactctgggtaccgtctcgtct **(SEQ ID NO:73)**

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFYATW
 AKGRFTISRDTTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS **(SEQ
 ID NO:74)**

Fc de gamma1 (compuesto por bisagra, CH2 y CH3)

Gacaaaactcacacatgccaccgtgccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctc
 aaggcgggacaggtgccctagagtgcctgcatccagggacaggccccagccgggtgctgac
 acgtccacctccatctcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctctctt
 cccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccttgaggtcacatgcgtggtgg
 tggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtg
 cataatgccaaagacaaagccgcggggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgt
 cctcacctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaaca
 aagcctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggtgggaccctggtgggtg
 cgagggccacatggacagaggccggctcggccccacctctgcctgagagtgaccgctgtac
 caacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgg
 gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcga
 catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccg
 tgetggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtgg
 cagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgca
 gaagagcctctccctgtctccgggtaaatga **(SEQ ID NO:75)**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK **(SEQ ID NO:76)**

Figura 6

Cadena ligera

Secuencia de codificación de A26 gL8 CK 2G4S 645 gL1 marc. c-myc (SEQ ID NO:77)

gatatccagatgaccagaggtccaagcagttctctccgccagcgtaggcgatcgtgtgactat
 tacctgtcgtgcaaccagagcatctacaacgctctggcttggatcagcagaaaccgggta
 aagcgccaaaactcctgatctacaacgcgaacactctgcataaccgggtgttccgtctcgttcc
 tctgctgtctgggtctggtagcagactctactctgaccatctcctctctgcagccggaagattt
 cgcgacctactactgccagcagtaactacgattaccactgacgtttgggtgggtggtaccaaag
 ttgagatcaaacgtacgggtgcagctccatccgtcttcatcttccaccgtctgacgaacag
 ctcaaactctggtagctctctgtcgtttgcctcctgaacaacttctatccgcgtgaagcgaa
 agtccagtggaagtcgacaacgcactccagttctggtaactctcaggaatctgtgaccgaac
 aggactccaaagactccacctactctctgtctagcaccctgactctgtccaaagcagactac
 gagaaacacaaagtgtacgcttgcgaagttaccatcaggggtctgagctctccggttaccaa
 aagctttaatagaggggagtggtccggaggcgggtggctctgggtggcgggtggatccgatatcg
 tgatgaccagaggtccaagcagtggttccgccagcgtaggcgatcgtgtgactattacctgt
 cagtctctccgagcgttgggtccaacttctgagctggtagcagcagaaaccgggtaagc
 cccgaaactgctgatctacgaggcgtctaaactgacctctgggtgtaccgtcccgtttcaaag
 gctctggctctggtagcagacttcaactctgaccatctcctctctgcagccggaagactttgca
 acgtactactgcgggtgggtggttactcttccatctctgacaccaggttcgggtgggtggcacc
 agttgaaatcaaacgtatgcatgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgtaa

La secuencia anterior está compuesta por lo siguiente

A26 gL8 (SEQ ID NO:78)

gatatccagatgaccagaggtccaagcagttctctccgccagcgtaggcgatcgtgtgactat
 tacctgtcgtgcaaccagagcatctacaacgctctggcttggatcagcagaaaccgggta
 aagcgccaaaactcctgatctacaacgcgaacactctgcataaccgggtgttccgtctcgttcc
 tctgctgtctgggtctggtagcagactctactctgaccatctcctctctgcagccggaagattt
 cgcgacctactactgccagcagtaactacgattaccactgacgtttgggtgggtggtaccaaag
 ttgagatcaaa

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
 SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:79)

CK (SEQ ID NO:80)

cgtagcgggtgcagctccatccgtcttcatcttccaccgtctgacgaacagctcaaactctgg
 tactgcttctgtcgtttgcctcctgaacaacttctatccgcgtgaagcgaaagtccagtgga
 aagtcgacaacgcactccagttctggtaactctcaggaatctgtgaccgaacaggactccaaa
 gactccacctactctctgtctagcaccctgactctgtccaaagcagactacgagaaacacaa
 agtgtacgcttgcgaagttaccatcaggggtctgagctctccggttaccaaaagctttaata
 gaggggagtggt

RTVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:81)

2G4S

Tccggagcgggtggctctgggtggcgggtggatcc
 SGGGGS

Figura 7

645 gL1

Gatatcgtgatgacccagagtccaagcagtggttccgccagcgtaggcgatcgtgtgactat
tacctgtcagtcctctccgagcgtttgggtccaacttctgagctggtaccagcagaaaccgg
gtaaagccccgaaactgctgatctacgaggcgtctaaactgacctctggtgtaccgtcccg
ttcaaaggctctggctctggtacggacttcactctgaccatctctctctgcagccggaaga
ctttgcaacgtactactgcggtggtggttactcttccatctctgacaccacgttcggtggtg
gcaccaaagttgaaatcaaacgt **(SEQ ID NO:82)**

DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSR
FKGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGGGTKVEIKR **(SEQ ID
NO:83)**

Marcaje c-myc

atgcatgaacaaaaactcatctcagaagaggatctg **(SEQ ID NO:84)**

MHEQKLISEEDL **(SEQ ID NO:85)**

Figura 8

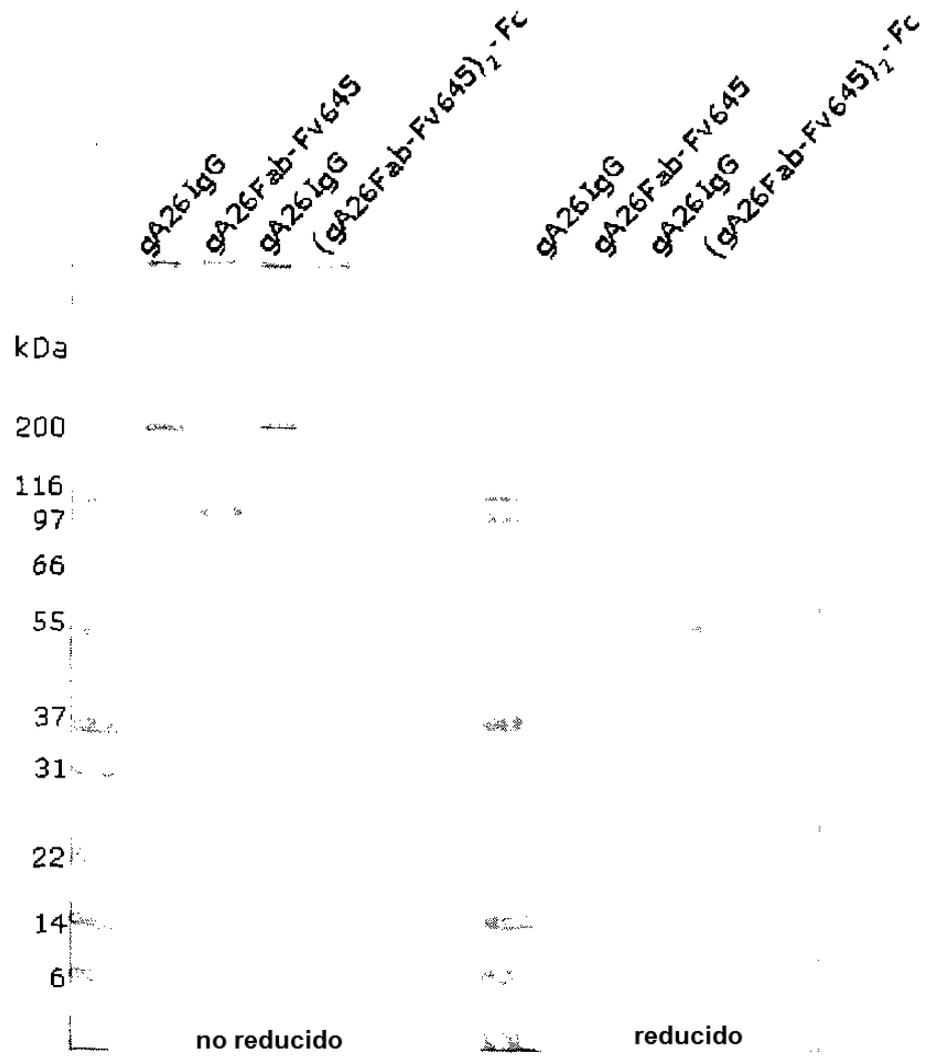


Figura 9

A26 gH2 gamma1-CH1 2G4S645gH1gamma1 Fc (SEQ ID NO:86)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQP
GGS LRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTYATWAKGRFTISR
DSTTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc de gamma1 (sin bisagra) (SEQ ID NO:87)

APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

A26 gL8 C24GS 645gL1 (sin marc. myc) (SEQ ID NO:88)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGRVTITC
QSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS GSGTDFTLTISLQPEDFA
TYYCGGGYSSISDITFGGGTKVEIKR