

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 729**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008** **E 12183573 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018** **EP 2535350**

54 Título: **Fusiones de anticuerpos con doble especificidad**

30 Prioridad:

**26.09.2007 GB 0718832**

**26.09.2007 GB 0718834**

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

**14.05.2018**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)**

**Allée de la Recherche 60**

**1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**HUMPHREYS, DAVID PAUL y**

**DAVE, EMMA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 667 729 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

Fusiones de anticuerpos con doble especificidad

La presente invención se refiere a nuevas proteínas de fusión de anticuerpos con doble especificidad. Dichos anticuerpos comprenden una primera especificidad para un antígeno de interés, y una segunda especificidad para un segundo antígeno de interés, por ejemplo una proteína sérica transportadora para su uso en la prolongación de su vida media en el suero *in vivo*. También se proporcionan métodos para la producción de dichas moléculas y composiciones farmacéuticas que las comprenden.

La gran especificidad y afinidad de los anticuerpos les hace agentes para diagnóstico y terapéuticos ideales, especialmente para modular las interacciones proteína:proteína. Los avances en el campo de la tecnología de anticuerpos recombinados han dado lugar a la producción de fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> y otros fragmentos de anticuerpos. Estas moléculas más pequeñas conservan la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos completos y pueden presentar también propiedades mejoradas de penetración en el tejido y farmacocinéticas en comparación con las moléculas de inmunoglobulina completas. De hecho, se proporcionan fragmentos de anticuerpos que son agentes terapéuticos versátiles, como se ve por el reciente éxito de los productos tales como ReoPro® y Lucentis®. Mientras que dichos fragmentos parecen presentar numerosas ventajas sobre las inmunoglobulinas completas, también adolecen de un aumento de la tasa de eliminación del suero ya que carecen del dominio Fc que confiere una larga durabilidad *in vivo* (Medasan *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 158: 2211-2217).

Los anticuerpos con doble especificidad, es decir, que se unen a dos antígenos diferentes se han descrito anteriormente (para reseñas, véase Segal *et al.*, 1999, *Curr. Opin. Immunol.* 11:558-562; Plückerthun & Pack, 1997, *Immunotechnology*, 3:83-105; Fischer y Leger, 2007, *Pathobiology*, 74, 3-14). Anticuerpos con doble especificidad también se describen en los documentos WO2002/02773, WO2004/003019, WO2004/032832, WO2004/041863, US2007/065440, US2006/257406, US2006/106203, US2006/280734 y US7.074.405. El último describe el uso de anticuerpos biespecíficos para diagnóstico por pre-reconocimiento y terapia. En particular, el documento US7.074.405 describe moléculas de anticuerpo biespecíficas que tienen al menos un brazo que se une específicamente a un tejido diana y al menos otro brazo que se une a un conjugado que se puede reconocer.

Las estrategias anteriores para preparar moléculas de anticuerpos heterobiespecíficos generalmente han empleado técnicas de reticulación química o de ingeniería de proteínas. La reticulación química adolece de rendimientos bajos de formación de hetero- y homo-dímeros y del requisito para su separación cromatográfica posterior. Las estrategias de ingeniería de proteínas han sido o bien muy elaboradas (p. ej., ingeniería de knobs-into-holes; Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9 (7):617-621) o han utilizado moléculas con características de estabilidad inadecuadas (p. ej., diacuerpos, scFv). En algunos casos los anticuerpos biespecíficos también pueden adolecer de problemas de impedimento estérico de modo que ambos antígenos no pueden unirse simultáneamente a cada brazo del anticuerpo.

Los anticuerpos de un solo dominio variable también conocidos como anticuerpos de un solo dominio o dAb, corresponden a las regiones variables de la cadena pesada (VH) o ligera (VL) de un anticuerpo. Los anticuerpos murinos de un solo dominio fueron descritos por Ward *et al.*, 1989, *Nature*, 341, 544-546. Anticuerpos de un solo dominio humanos y humanos 'camelizados' también se han descrito (Holt *et al.*, 2003, *Trends in Biotechnology*, 21, 484-490). Anticuerpos de un solo dominio también se han obtenido de camélidos (camellos y llamas) y peces cartilagosos (tiburón alfombra telesado y tiburón nodriza). Estos organismos han desarrollado dominios V únicos de gran afinidad (denominados VhH en los camélidos y V-NAR en los tiburones), montados en un marco de dominio constante equivalente a Fc como un componente íntegro y crucial de su sistema inmunitario (véase Holliger y Hudson, para una reseña, 2005, *Nature Biotechnology*, 23(9):1126-1136).

En la patente europea EP0368684 se han descrito fusiones anticuerpo-enzima de un solo dominio. Las fusiones de grupo efector de un solo dominio se han descrito también en el documento WO2004/058820 que comprende un solo dominio variable. Las inmunoglobulinas de dominio variable doble se han descrito en el documento WO2007/024715. Los ligandos de doble especificidad que comprenden dos anticuerpos de un solo dominio con especificidades diferentes se han descrito en la patente europea EP 1.517.921.

Shen *et al.*, describen anticuerpos de un solo dominio variable como un bloque de construcción versátil para la construcción de anticuerpos biespecíficos de tipo IgG (*Journal of Immunological Methods*, vol. 318, no. 1-2, 3 Enero 2007, páginas 65-74). Harmsen *et al.*, describen que se observó el tiempo de permanencia prolongado *in vivo* para un fragmento de anticuerpo de un solo dominio de llama (*Vaccine* vol. 23, no. 41, 30 Septiembre 2005, páginas 4926-4934). En el paper *Arthritis and Rheumatism* vol. 54, no. 6, 1 Junio 2006 páginas 1856-1866, Coppieters *et al.*, describen como las proteínas VHH alfa del factor de necrosis anti-tumoral formateadas derivadas de camélidos mostraban una potencia y direccionalidad superior a articulaciones inflamadas en un modelo murino de artritis inducida por colágeno.

Se conocen medios para mejorar la vida media de fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y otros fragmentos de anticuerpos. Una estrategia ha sido conjugar el fragmento con moléculas de polímero. Por lo

tanto, la vida media de corta circulación de los fragmentos Fab', F(ab')<sub>2</sub> en animales se ha mejorado por conjugación con polietilenglicol (PEG; véase, por ejemplo, WO98/25791, WO99/64460 y WO98/37200). Otra estrategia ha consistido en modificar el fragmento de anticuerpo mediante conjugación a un agente que interactúa con el receptor FcRn (véase, por ejemplo, el documento WO97/34631). Sin embargo, otra estrategia para prolongar la vida media ha sido usar polipéptidos que se unen a albúmina de suero (véase, por ejemplo, Smith *et al.*, 2001, *Bioconjugate Chem.* 12:750-756; EP0486525; US6.267.964; WO2004/001064; WO2002/076489; y el documento WO2001/45746). Sin embargo, todavía sigue habiendo necesidad de producir proteínas de inmunoglobulina de unión a antígeno que tienen una larga vida media *in vivo*, como alternativa a las que tienen una vida media larga debido a que interactúan con el receptor FcRn, sin estar químicamente modificadas por conjugación a PEG, o estar conjugadas con albúmina de suero humano.

Existe una variedad de proteínas en el plasma e incluyen proteína de unión a tiroxina, transtiretina,  $\alpha$ -1-glucoproteína ácida, transferrina, fibrinógeno y albúmina, o un fragmento de cualquiera de las mismas. Las proteínas séricas transportadoras circulan dentro del cuerpo con vidas medias medidas en días, por ejemplo, 5 días para la proteína de unión a tiroxina o 2 días para transtiretina (Bartalena y Robbins, 1993, *Clinics in Lab. Med.* 13:583-598), o 65 horas en la segunda fase de recambio de  $\alpha$ -1-glucoproteína ácida yodada (Bree *et al.*, 1986, *Clin. Pharmacokin.* 11:336-342). Los datos de Gitlin *et al.* (1964, *J. Clin. Invest.* 10:1938-1951) sugieren que en mujeres embarazadas, la vida media de la  $\alpha$ -1-glucoproteína ácida es de 3,8 días, de 12 días para la transferrina y de 2,5 días para el fibrinógeno. La albúmina sérica es una proteína abundante tanto en compartimientos vasculares como extravasculares con una vida media en el hombre de aproximadamente 19 días (Peters, 1985, *Adv. Protein Chem.* 37: 161-245). Esto es similar a la vida media de IgG1, que es de aproximadamente 21 días (Waldeman y Strober, 1969, *Progr. Allergy*, 13:1-110).

La presente invención proporciona proteínas de fusión de anticuerpos de doble especificidad mejoradas que se pueden producir de forma recombinante y son capaces de unir dos antígenos simultáneamente,

En particular se proporcionan proteínas de fusión de anticuerpos con doble especificidad que comprenden un fragmento Fab o Fab' de anticuerpo con especificidad para un antígeno de interés, estando dicho fragmento genéticamente fusionado con dos anticuerpos que tienen especificidad para albúmina sérica humana, en donde un anticuerpo de un solo dominio se fusiona con el C terminal de la cadena ligera del fragmento Fab o Fab' mediante un ligante y el otro anticuerpo de un solo dominio se fusiona al C terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' mediante un ligante y en donde un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo con dominio VH y el otro dominio único es un dominio VL y los dominios VH y VL son un par VH/VL complementario que se unen al antígeno seleccionado de forma cooperativa y el anticuerpo de un solo dominio de VH se fusiona con el C terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' y el dominio VL se fusiona al C terminal de la cadena ligera del fragmento Fab o Fab' y

(i) el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:56 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:57 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:58 para CDR-H3 y el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:59 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:60 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:61 para CDR-L3 o

(ii) el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:62 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:63 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:64 para CDR-H3 y el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:65 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:66 para CDR-L2 la secuencia dada en SEQ ID NO:67 para CDR-L3.

Una fusión de anticuerpos de doble especificidad de la invención podrá unirse selectivamente a dichos dos antígenos.

En una realización, un antígeno de interés unido por el fragmento Fab o Fab' puede ser una proteína asociada a la célula, por ejemplo una proteína de la superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tales como las proteínas que aumentan durante la enfermedad o infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos específicos de proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas  $\beta$ 1 p. ej., VLA-4, selectina E, selectina P o selectina L, 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, DRCP1, DRCP1, dudulina2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nectina tipo 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos MHC de clase I y MHC de clase II, y VEGF, y cuando proceda, 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 del citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$  o interferón  $\gamma$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\beta$ , factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento

derivados de plaquetas tales como PDGF- $\alpha$ , y PDGF- $\beta$  y donde proceda uno de sus receptores apropiados. Otros antígenos incluyen antígenos de superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus, tales como de la gripe, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionúclidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

- 5 En una realización, las proteínas de fusión de anticuerpos de la invención pueden emplearse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, las proteínas de fusión de anticuerpos pueden neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.

Como se emplea en esta memoria, 'un polipéptido de selección' incluye un Fc $\gamma$ R tales como Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, una proteína de la ruta del complemento tales como, pero sin limitación, C1q y C3, una proteína marcadora CD (grupo de marcador de diferenciación), tales como, pero sin limitación, CD68, CD115, CD116, CD80, CD83, CD86, CD56, CD64, CD3, CD4, CD8, CD28, CD45, CD19, CD20 y CD22. Otros polipéptidos de selección que son proteínas marcadoras CD incluyen CD1, CD1d, CD2, CD5, CD8, CD9, CD10, CD11, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD40, CD43, CD44, CD45, CD46, CD49, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD61, CD62, D62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD66e, CD68, CD70, CD71, CD72, CD79, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD88, CD89, CD90, CD94, CD95, CD98, CD106, CD114, CD116, CD117, CD118, CD120, CD122, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD137, CD138, CD141, CD142, CD143, CD146, CD147, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD162, CD164, CD169, CD184, CD206, CD209, CD257, CD278, CD281, CD282, CD283 y CD304, o un fragmento de cualquiera de los mismos que conserva capacidad para seleccionar la función efectora mediada por células, ya sea directa o indirectamente. Un polipéptido de selección también incluye moléculas de inmunoglobulina, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE e IgA que poseen función efectora.

En una realización, se proporciona una proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad aislada según la presente descripción en donde dichos anticuerpos de un solo dominio proporcionan una vida media prolongada al fragmento de anticuerpo con especificidad para dicho antígeno de interés al unirse a dicha proteína sérica transportadora.

Como se emplea en esta memoria, 'proteínas séricas transportadoras' incluyen la proteína de unión a tiroxina, transtiretina,  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida, transferrina, fibrinógeno y albúmina, o un fragmento de una cualquiera de ellas.

- 30 Como se emplea en esta memoria, una 'molécula circulante de inmunoglobulina' incluye IgG1, IgG2, IgG3, sIgG4, sIgA, IgM e IgD, o un fragmento de cualquiera de ellas.

CD35/CR1 es una proteína presente en los glóbulos rojos que tienen una vida media de 36 días (intervalo normal de 28 a 47 días; Lanaro et al., 1971, Cancer, 28(3):658-661).

Como se ha discutido anteriormente, la segunda proteína para la que el dAb tiene especificidad es la proteína sérica transportadora humana. En una realización más preferida, la proteína sérica transportadora es albúmina de suero humano.

En una realización, el fragmento de anticuerpo con especificidad para un antígeno de interés es un fragmento Fab. En otra realización, el fragmento de anticuerpo con especificidad para un antígeno de interés es un fragmento Fab'.

Por lo tanto, en una realización más preferida, las proteínas de fusión de anticuerpos de la invención son proteínas de fusión de traducción, es decir, fusiones genéticas, la secuencia de cada una de los cuales está codificada por un vector de expresión. Alternativamente, los componentes de la proteína de fusión de anticuerpos se han fusionado empleando medios químicos, es decir, por conjugación química o reticulación química. Dichos medios químicos son conocidos en la técnica.

En un ejemplo, los fragmentos de anticuerpos son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o modificada. Cuando el fragmento de anticuerpo para su uso en la preparación de una proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad de la invención es un fragmento Fab', dicho fragmento está generalmente prolongado en el C terminal de la cadena pesada por uno o más aminoácidos. Por lo tanto, una fusión de anticuerpo de la invención puede comprender una traducción del fragmento Fab' fusionado (o fusionado químicamente) a un dAb mediante un ligante. Además, ejemplos de fragmentos Fab' de anticuerpo adecuados incluyen los descritos en los documentos WO2005/003170 y WO2005/003171.

En otro ejemplo, los fragmentos de anticuerpos son fragmentos Fab. Por lo tanto, una fusión de anticuerpos de la invención puede comprender una traducción del fragmento Fab fusionada (o químicamente fusionada) a una secuencia de ligante que a su vez es la traducción fusionada (o químicamente fusionada) a un dAb. Preferiblemente, el fragmento Fab es un fragmento Fab que termina en las cisteínas de entre la cadena, como se describe en el documento WO2005/003169.

Los fragmentos Fab o Fab' de anticuerpos de uso en la presente invención pueden ser de cualquier especie, pero

preferiblemente provienen de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano o son fragmentos humanizados. Un fragmento de anticuerpo para su uso en la presente invención puede proceder de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina y puede obtenerse a partir de cualquier especie, como por ejemplo, ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano.

- 5 En una realización, el fragmento Fab o Fab' de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo monoclonal, completamente humano, humanizado o híbrido. En una realización, los fragmentos Fab o Fab' de anticuerpo son completamente humanos o están completamente humanizados.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden generarse usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales por clonación y expresión los ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, por los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 93(15), 7843-7848, WO92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (RDC) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US5.585.089).

Los anticuerpos para su uso en la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de exposición en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos 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; WO 90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; y WO95/20401; y los documentos de patente nos US5.698.426; 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. También, los ratones transgénicos, u otros organismos, como por ejemplo otros mamíferos, se pueden usar para generar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (si están presentes) tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras son todas de origen humano, o substancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos por ejemplo por los métodos de exposición en fagos descritos anteriormente y los anticuerpos producidos por ratones en los cuales genes con región variable y constante de inmunoglobulina de murina han sido reemplazados por sus contrapartidas humanas, p. ej. como se describe en términos generales en los documentos EP0546073B1, US5.545.806, US5.569.825, US5.625.126, US5.633.425, US5.661.016, US5770429, EP0438474B1 y EP0463151B1.

El material de partida del fragmento de anticuerpo Fab o Fab' para su uso en la presente invención puede obtenerse a partir de cualquier anticuerpo entero, especialmente un anticuerpo monoclonal entero, utilizando cualquier técnica de escisión enzimática y/o de digestión adecuada, por ejemplo por tratamiento con pepsina. Alternativamente, o además del material de partida de anticuerpos se puede preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinado que implican la manipulación y la reexpresión de ADN que codifica regiones variables y/o constantes de anticuerpos. Técnicas de biología molecular convencionales pueden usarse para modificar, añadir o eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Algunas alteraciones a las regiones variables o constantes todavía están comprendidas por los términos regiones 'variable' y 'constante', como se emplea en esta memoria.

El material de partida de fragmentos de anticuerpos puede obtenerse de cualquier especie como por ejemplo ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Las partes del fragmento de anticuerpo pueden obtenerse de más de una especie, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden ser híbridos. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El material de partida de fragmentos de anticuerpos también puede modificarse. En otro ejemplo, la región variable del fragmento de anticuerpo se ha creado empleando técnicas de ingeniería de ADN recombinado. Dichas versiones por ingeniería genética incluyen las creadas por ejemplo a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, supresiones o cambios en o a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Los ejemplos específicos de este tipo incluyen los dominios de la región variable modificados genéticamente que contienen al menos una RDC y, opcionalmente, uno o más aminoácidos marco de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo. Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Boss *et al.*, US4.816.397; Cabilly *et al.*, US6.331.415; Shrader *et al.*, WO92/02551; Ward *et al.*, 1989, *Nature*, 341, 544; Orlandi *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 3833; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 322, 323; Bird *et al.*, 1988, *Science*, 242, 423; Queen *et al.*, US5.585.089; Adair, WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10, 1-142; Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181).

En la presente invención, cada anticuerpo de un solo dominio está fusionado al fragmento Fab o Fab' mediante un ligante.

5 Ejemplos de regiones ligantes adecuadas para unir un dAb a un Fab o Fab' incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ligantes flexibles y secuencias de ligantes rígidos. Las secuencias de ligantes flexibles incluyen las descritos en Huston *et al.*, 1988, *PNAS* 85:5879-5883; Wright & Deonarain, *Mol. Immunol.*, 2007, 44(11):2860-2869;. Alfthan *et al.*, *Prot. Eng.*, 1995, 8(7):725-731;. Luo *et al.*, *J. Biochem.*, 1995, 118(4):825-831; Tang *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(26):15682-15686; y Turner *et al.*, 1997, *JIMM* 205, 42-54 (véase la Tabla 1 para ejemplos representativos).

Tabla 1. Secuencias de ligantes flexibles

SEQ ID n°:	SECUENCIA
1	SGGGGSE
2	DKTHTS
3	GGGGS
45	GGGGSGGGGS
46	GGGGSGGGGS
47	GGGGSGGGGS
48	GGGGSGGGGS
4	AAAGSG-GASAS
5	AAAGSG-XGGGS-GASAS
49	AAAGSG-XGGGSXGGGS-GASAS
50	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
51	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
6	AAAGSG-XS-GASAS
7	PGGNRGTITRRPATTTGSSPGPTQSHY
8	ATTTGSSPGPT
9	ATTTGS
-	GS
10	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
11	GTVAAPSVFIFPPSD
12	GGGGIAPSMVGGGGS
13	GGGGKVEGAGGGGGS
14	GGGGSMKSHDGGGGS

SEQ ID nº:	SECUENCIA
15	GGGGNLITIVGGGGS
16	GGGGVPSLPGGGGS
17	GGEKSIPGGGGS
18	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
19	YPRSIYIRRRHPSPLTT
20	TPSHLSHILPSFGLPTFN
21	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
22	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
23	APGPSAPSHRSLPSRAFG
24	PRNSIHFLHPLLVA PLGA
25	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
26	SPQYPSPLTLTLPHPSL
27	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
28	LPWRTSLLPSLPLRRRP
29	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
30	VPPAPVVSLRSAHARPPY
31	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
32	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
33	CNPLLPLCARSPAVR TFP

Ejemplos de ligantes rígidos incluyen las secuencias de péptidos GAPAPAAPAPA (SEQ ID nº: 34), PPPP (SEQ ID nº: 35) y PPP.

5 En una realización, una secuencia bisagra de anticuerpos o parte de la misma se utiliza como ligante, p. ej. la secuencia bisagra superior. Por lo general, los fragmentos Fab' de anticuerpo para su uso en la presente invención poseen una región bisagra natural o modificada. Dichas regiones bisagra se utilizan como ligante natural al resto dAb. La región bisagra nativa es la región bisagra normalmente asociada al dominio C<sub>H</sub>1 de la molécula de anticuerpo. Una región bisagra modificada es cualquier bisagra que difiere en longitud y/o composición de la región bisagra natural. Dichas bisagras pueden incluir regiones bisagra de cualquier otra especie, tales como regiones bisagra de ser humano, ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama o cabra. Otras regiones bisagra modificadas pueden comprender una región bisagra completa procedente de un anticuerpo de una clase o subclase diferente de la del dominio C<sub>H</sub>1. Así, por ejemplo, un dominio C<sub>H</sub>1 de clase  $\gamma$ 1 puede estar unido a una región bisagra de clase  $\gamma$ 4. Alternativamente, la región bisagra modificada puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad de repetición en la que cada unidad en la repetición procede de una región bisagra natural. En una alternativa adicional, la región bisagra natural puede alterarse al convertir uno o más restos de cisteína u otros restos en restos neutros, tal como de alanina, o al convertir restos colocados adecuadamente en restos de cisteína. Por dichos medios el número de restos de cisteína en la región bisagra puede aumentar o disminuir. Además pueden controlarse otras

10

15

- características de la bisagra, tales como la distancia de la(s) cisteína(s) de la bisagra de la cisteína entre la cadena de la cadena ligera, la distancia entre las cisteínas de la bisagra y la composición de demás aminoácidos en la bisagra que puede afectar propiedades de la bisagra tales como la flexibilidad, p. ej. pueden incorporarse glicinas en la bisagra para aumentar la flexibilidad de rotación o pueden incorporarse prolinas para reducir la flexibilidad.
- 5 Alternativamente combinaciones de restos cargados o hidrófobos pueden incorporarse en la bisagra para conferir propiedades de polimerización, véase por ejemplo, Richter *et al.*, 2001, *Prot. Eng.* 14(10):775-783 para el uso de colas cargadas o iónicas, p. ej., colas ácidas como ligantes y Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 5(1):1547-1553 para las secuencias de cremallera de leucina. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser totalmente sintéticas y pueden diseñarse para que posean propiedades deseadas tales como la longitud, la composición y la flexibilidad.
- 10 Una serie de regiones bisagra modificadas se han descrito ya por ejemplo, en los documentos US5.677.425, US6.642.356, WO99/15549, WO2005/003170, WO2005/003169, WO2005/003170, WO98/25971 y WO2005/003171 y éstos están incorporados en la presente memoria por referencia. Dichas bisagras siguen generalmente en la región CH1, pero también pueden incorporarse en el extremo de la región constante de un fragmento kappa o lambda de la cadena ligera; véase la Tabla 2 para ejemplos.
- 15 TABLA 2. Secuencias de ligantes bisagra

SEQ ID n°:	SECUENCIA
36	DKTHTCAA
37	DKTHTCPPCPA
38	DKTHTCPPCPATCPPCPA
39	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
40	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
41	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
42	DKTHTCCVECPCPA
43	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
44	DKTHTCPSCPA

- Se pueden generar dominios variables únicos también conocidos como anticuerpos de un solo dominio o dAb utilizando métodos conocidos en la técnica e incluyen los descritos en el documento WO2005/118642, Ward *et al.*, 1989, *Nature*, 341, 544-546 y Holt *et al.*, 2003, *Trends in Biotechnology*, 21, 484-490. En una realización, un anticuerpo de un solo dominio para su uso en la presente invención es un dominio variable de cadena pesada (VH) o un dominio de la cadena ligera (VL). Cada dominio de la cadena ligera puede ser del subgrupo kappa o lambda. Los métodos para aislar los dominios VH y VL se han descrito en la técnica, véase por ejemplo la patente europea EP0368684 y Ward *et al.*, anteriormente. Dichos dominios pueden proceder de cualquier especie o material de partida de anticuerpos adecuados. Un anticuerpo de un solo dominio puede proceder de un roedor, un ser humano o de otras especies. En una realización, el anticuerpo de un solo dominio está humanizado.
- 20
- 25

- Un anticuerpo de un solo dominio puede estar derivado de una biblioteca de exposición en fagos, utilizando los métodos descritos en, por ejemplo, el documento WO2005/118642, Jespers *et al.*, 2004, *Nature Biotechnology*, 22, 1161-1165 y Holt *et al.*, 2003, *Trends in Biotechnology*, 21, 484-490. Dichos anticuerpos de un solo dominio son completamente humanos, pero también se pueden proceder de otras especies. Se valorará que la secuencia del anticuerpo de un solo dominio, una vez aislada pueda modificarse para mejorar las características del anticuerpo de un solo dominio, por ejemplo la solubilidad, como se describe en Holt *et al.*, anteriormente.
- 30

Un dAb que es una secuencia humana completa se puede obtener de la exposición en fago scFv o a partir de un roedor Humouse™ o Velocimouse™ transgénico o humanizado.

- Un dAb se puede obtener de un ser humano o de un roedor humanizado, un camélido o un tiburón. Dicho dAb será generalmente humanizado. Un anticuerpo de un solo dominio, que es un dominio VHH a base de inmunoglobulinas de camélidos se describe en la patente europea EP0656946. Un camello o una llama se puede inmunizar con un antígeno de interés y la sangre se recoge cuando el valor es apropiado. El gen que codifica el dAb se puede clonar
- 35



por RCP en una sola célula, o el/los linfocito(s) B que codifica(n) el dAb puede(n) immortalizarse por transformación de VEB, o por fusión a una línea celular inmortal.

5 En una realización la presente invención proporciona una proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad que comprende o consiste en un fragmento Fab o Fab' de anticuerpo con especificidad para un antígeno de interés, estando dicho fragmento fusionado a dos anticuerpos de un solo dominio en donde un anticuerpo de un solo dominio está fusionado al C terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab', teniendo dichos anticuerpos de un solo dominio especificidad para dicho segundo antígeno de interés, como se describe en la presente memoria.

10 Cada una de las cadenas pesada y ligera de fragmento Fab o Fab' comprende un anticuerpo de un solo dominio en el C terminal, los dos anticuerpos de un solo dominio, que son un par VH/VL complementario que se unen al antígeno cooperativamente es decir, son un par VH/VL complementario que tiene la misma especificidad de unión. Por lo general será un par VH/VL procedente del mismo anticuerpo.

15 En particular se proporciona una proteína de fusión al anticuerpo con doble especificidad de la presente invención comprende dos anticuerpos de un solo dominio que son un par VH/VL complementario, el anticuerpo de un solo dominio VH se fusiona al C terminal de la región constante de la cadena pesada (CH1) y el anticuerpo de un solo dominio VL se fusiona al C terminal de la región constante de la cadena ligera (C kappa o C lambda).

En las proteínas de fusión con doble especificidad de la presente invención, los anticuerpos de un solo dominio se unen a un segundo antígeno, diferente del que se une por el componente del fragmento Fab o Fab'.

20 Los dAb para su uso en la presente invención presentan especificidad para una proteína transportadora del suero, es decir, albúmina de suero humano. Un conejo, ratón, rata, camello o una llama se pueden inmunizar con una proteína transportadora del suero (por ejemplo, albúmina de suero humano), y se recoge la sangre cuando el valor es apropiado. El gen que codifica el dAb se puede clonar por RCP en una sola célula, o el/los linfocito(s) B que codifica(n) el dAb puede immortalizarse por transformación de VEB, o por fusión a una línea celular inmortal. Alternativamente, el anticuerpo de un solo dominio se puede obtener por exposición en fagos como se describió en la presente memoria anteriormente.

25 El anticuerpo o los anticuerpos de un solo dominio empleados en la presente invención se unen a albúmina de suero humano y se pueden también unir a albúmina de suero murino y albúmina de suero de rata.

Los anticuerpos de un solo dominio que se unen a albúmina de suero se describen en el documento WO2005/118642 (véase, por ejemplo las figuras 1c y 1d), el documento WO2004/041862 y la tabla III del documento WO2006/122787.

30 En otra realización, un anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de un solo dominio VH de cadena pesada, en donde el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID n°: 56 para RDC-H1, la secuencia dada en SEQ ID n°: 57 para RDC-H2 y la secuencia dada en SEQ ID n°: 58 para RDC-H3.

35 En otra realización, un anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de un solo dominio de cadena pesada VH, en donde el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID n°: 62 para RDC-H1, la secuencia dada en SEQ ID n°: 63 para RDC-H2 y la secuencia dada en SEQ ID n°: 64 para RDC-H3.

40 En una realización, un anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de un solo dominio de cadena pesada VH humanizado, dAbH1, que tiene la secuencia dada en la figura 5 (a)(SEQ ID n°: 52). Un ejemplo de una fusión CH1-dAbH1 adecuada que comprende un ligante G<sub>4</sub>S se da en la figura 6 (SEQ ID n°: 68).

En una realización, el anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de un solo dominio de cadena pesada VH humanizado, dAbH2, que tiene la secuencia dada en la figura 5 c) (SEQ ID n°: 54).

45 Un ejemplo de una fusión CH1-dAbH2 adecuada que comprende un ligante G<sub>4</sub>S se da en la figura 6 (SEQ ID n°: 69).

Los restos en los dominios variables de anticuerpos se numeran convencionalmente según un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. (en adelante "Kabat *et al.* (anteriormente)"). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria salvo que se indique lo contrario.

50 Las denominaciones de los restos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, ya sea marco o región determinante de complementariedad (RDC), de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación

de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

5 Las RDC del dominio variable de cadena pesada se encuentran en los restos 31-35 (RDC-H1), restos 50-65 (RDC-H2) y restos 95-102 (RDC-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A. M. *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)), el equivalente del bucle a RDC-H1 se extiende desde el resto 26 al resto 32. Por lo tanto 'RDC-H1', como se emplea en esta memoria, comprende los restos 26 a 35, como se describe mediante una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia.

Las RDC del dominio variable de cadena ligera se encuentran en los restos 24-34 (RDC-L1), los restos 50-56 (RDC-L2) y los restos 89-97 (RDC-L3) según el sistema de numeración de Kabat.

10 En otra realización, un anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio VL de la cadena ligera, en donde el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID n°: 59 para RDC-L1, la secuencia dada en SEQ ID n°: 60 para RDC-L2 y la secuencia dada en SEQ ID n°: 61 para RDC-L3.

15 En otra realización, un anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio VL de la cadena ligera, en donde el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID n°: 65 para RDC-L1, la secuencia dada en SEQ ID n°: 66 para RDC-L2 y la secuencia dada en SEQ ID n°: 67 para RDC-L3.

20 En una realización, un anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de un solo dominio VL de cadena ligera humanizado, dAbL1, que tiene la secuencia dada en la figura 5 (b) (SEQ ID n°: 53). Un ejemplo tanto de una fusión CH1-dAbL1 adecuada como de una fusión Ck1-dAbL1 que comprende un ligante G<sub>4</sub>S se da en la figura 6 (SEQ ID n°: 70 y SEQ ID n°: 72).

En una realización, un anticuerpo de un solo dominio que se une a la albúmina de suero humano para su uso en la presente invención es un anticuerpo de un solo dominio VL de cadena ligera humanizado, dAbL2, que tiene la secuencia dada en la figura 5 (d) (SEQ ID n°: 55). Un ejemplo tanto de una fusión CH1-dAbL2 adecuada como de una fusión CK1-dAbL2 que comprende un ligante G<sub>4</sub>S se da en la figura 6 (SEQ ID n°: 71 y SEQ ID n°: 73).

25 En una realización donde las cadenas pesadas y ligeras de fragmento Fab o Fab' comprenden cada una un anticuerpo de un solo dominio en el C terminal y los dos anticuerpos de un solo dominio son un par VH/VL complementario que se une al antígeno cooperativamente como se describió anteriormente en esta memoria, el dAb con VH es dAbH1 (SEQ ID n°: 52) y el dAb con VL es dAbL1 (SEQ ID n°: 53).

30 En una realización donde las cadenas pesadas y ligeras de fragmento Fab o Fab' comprenden cada una un anticuerpo de un solo dominio en el C terminal los dos anticuerpos de un solo dominio son un par VH/VL complementario que se unen al antígeno cooperativamente como se describió anteriormente en esta memoria, el dAb con VH es dAbH2 (SEQ ID n°: 54) y el dAb con VL es dAbL2 (SEQ ID n°: 55).

35 Cuando los anticuerpos de un solo dominio de la proteína de fusión con doble especificidad de la presente invención se unen a la albúmina la afinidad de unión para la albúmina será suficiente para prolongar la vida media de los fragmentos Fab o Fab' *in vivo*. Se ha descrito que una afinidad para la albúmina de menos de o igual a 2,5  $\mu$ M de afinidad prolongará la vida media *in vivo* (Nguyen, A. *et al.* (2006) *Protein Engineering, Design & Selection*, 19(7), 291-297). Las moléculas de anticuerpo de un solo dominio de la presente invención tienen preferiblemente una afinidad de unión adecuada para su propósito y el antígeno al que se unen. En un ejemplo los anticuerpos de un solo dominio tienen una gran afinidad de unión, por ejemplo picomolar. En un ejemplo los anticuerpos de un solo dominio tienen una afinidad de unión para el antígeno que es nanomolar o micromolar. La afinidad puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como por ejemplo BIAcore como se describe en los ejemplos en este documento usando antígeno natural o biotecnológico.

45 Preferiblemente, las moléculas de anticuerpo de un solo dominio de la presente invención que se unen a albúmina tienen una afinidad de unión de aproximadamente 2  $\mu$ M o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de un solo dominio de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 1  $\mu$ M o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de un solo dominio de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 500 nM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de un solo dominio de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 200 nM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de dominio de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 1 nM o mejor. Se valorará que la afinidad de anticuerpos de un solo dominio proporcionados por la presente invención y conocidos en la técnica puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Las variantes pueden obtenerse por una serie de protocolos de maduración de afinidad incluida la mutación de las RDC (Yang *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 254 392-403, 1995), mezclado de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 250 359-368, 1996), mezclado de ADN (Patten *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), exposición en fagos (Thompson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) y RCP sexual (Cramer *et al.*, *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (anteriormente) expone estos métodos de maduración de afinidad.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica una proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad de la presente invención. Las secuencias de ADN de la presente invención pueden comprender ADN sintético, por ejemplo producido por tratamiento químico, ADNc, ADN genómico o una cualquiera de sus combinaciones.

5 Las secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad de la presente invención pueden obtenerse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte de los fragmentos de anticuerpo o todos ellos, los ligantes y/o los dAb pueden sintetizarse como se desee a partir de determinadas secuencias de ADN o sobre la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

10 Pueden emplearse técnicas normalizadas de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad de la presente invención. Secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Pueden usarse según proceda técnicas de mutagenia dirigida al sitio y reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

15 La presente invención se refiere además a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad de la presente invención. En una realización preferida, el vector de clonación o de expresión comprende una única secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad. Por lo tanto, el vector de clonación o de expresión comprende unidades de transcripción codificadas por ADN en la secuencia de tal manera que se produce una proteína de fusión a partir de la traducción.

De hecho, los expertos en la técnica entenderán que una proteína de fusión de la invención tiene el dAb en el C terminal y por lo tanto, la unidad de transcripción codificada de ADN dAb será la última, respectivamente, dentro de la secuencia de ADN que codifica la fusión de traducción. Además, una fusión de traducción comprende un Fab o Fab' con N terminal y un dAb con C terminal.

25 Se apreciará que la cadena pesada y la cadena y ligera del Fab o Fab' pueda incorporarse en el mismo o diferentes vectores. En una realización un vector puede comprender una fusión a partir de la traducción que comprende una cadena pesada de Fab o Fab' y un dAb con C terminal y otro vector puede comprender una fusión a partir de traducción que comprende una cadena ligera de Fab o Fab' y un dAb con C terminal.

30 Por ejemplo, cuando se desea producir una proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad con el resto de dAb en el extremo del C terminal del fragmento de anticuerpo, el vector comprenderá unidades de transcripción de ADN en el orden de la secuencia; una unidad de transcripción de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo, opcionalmente una unidad de transcripción de ADN que codifica una secuencia ligante, y una unidad de transcripción de ADN que codifica un resto dAb con especificidad para una proteína sérica transportadora, por ejemplo, albúmina de suero humana. Por lo tanto, una fusión a partir de la traducción de la invención puede estar en diferentes configuraciones como, por ejemplo pero sin limitación, Fab-ligante-dAb, Fab'-ligante-dAb. Cuando se utilizan dos vectores por ejemplo, el primero puede comprender la cadena pesada de un Fab o Fab' fusionado a un dAb y el segundo puede comprender la cadena ligera de un Fab o Fab' fusionado a un dAb.

35 El código del ADN para un fragmento de anticuerpo comprendido dentro de una fusión a partir de la traducción de la invención puede incorporarse en un vector como una unidad de transcripción en configuraciones como las conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo una unidad de transcripción puede comprender el código para la cadena ligera seguido del código para la cadena pesada, o viceversa; véase, en particular, Humphreys *et al.*, 2002, *Protein Expression and Purification*, 26:309-320.

Preferiblemente, un vector según la presente invención comprende una secuencia principal adecuada, tal como una secuencia principal de anticuerpos. Dichas secuencias principales son bien conocidas en la técnica.

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

50 También se proporciona una célula anfitriona que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad de la presente invención. Cualquier sistema de células anfitrionas/vector adecuado puede utilizarse para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad. Pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros microbianos o eucarióticos, por ejemplo de mamíferos, también pueden utilizarse sistemas de expresión de células anfitrionas. Células anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen células NSO, CHO, de mieloma o de hibridoma. Por consiguiente, en una realización, la proteína de fusión de la presente invención se expresa en *E. coli*. En otra realización, la proteína de fusión de la presente invención se expresa en células de mamífero.

- La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad que comprende cultivar una célula anfitriona que comprende un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de proteínas a partir de la secuencia de ADN que codifica dicha proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad. La invención proporciona además métodos para aislar la proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad.
- En la producción, una proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad de la presente invención puede purificarse, en caso necesario, usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, pero sin limitación, se pueden utilizar técnicas cromatográficas, tales como intercambio iónico, exclusión por tamaño, proteína G o cromatografía de interacción hidrófoba.
- El tamaño de una proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad puede confirmarse por métodos convencionales conocidos en la técnica tales como cromatografía por exclusión por tamaño y SDS-PAGE no reductora. Dichas técnicas pueden utilizarse para confirmar que la proteína no se ha dimerizado y/o no tiene una parte que falta, p. ej., la parte del dAb. Si se detectan dímeros entonces la proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad monomérica se puede purificar lejos de las especies diméricas utilizando técnicas de cromatografía convencionales como se describió anteriormente.
- Las proteínas de fusión de anticuerpos con doble especificidad de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos como por ejemplo enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades inmunitarias y trastornos, trastornos fibróticos y cánceres.
- La terminología “enfermedad inflamatoria” o “trastorno” y “enfermedad o trastorno inmunitario” incluye la artritis reumatoide, la artropatía psoriásica, la enfermedad de Still, la enfermedad Muckle Wells, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LED (lupus eritematoso disseminado), asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mellitus de tipo I, trasplante y enfermedad de injerto contra anfitrión.
- La expresión “trastorno fibrótico” incluye fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerosis generalizada (o esclerodermia), fibrosis renal, nefropatía diabética, nefropatía por IgA, hipertensión, enfermedad renal en fase terminal, fibrosis peritoneal (diálisis peritoneal ambulatoria continua), cirrosis hepática, degeneración macular debida a la edad (ARMD), retinopatía, fibrosis reactiva cardíaca, cicatrices, queloides, quemaduras, úlceras de la piel, angioplastia, derivación coronaria, artroplastia y cirugía de cataratas.
- El término “cáncer” incluye un nuevo crecimiento maligno que surge del epitelio, se encuentra en la piel o, más frecuentemente, el revestimiento de órganos del cuerpo, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestinos. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y la propagación (metástasis) a órganos distantes, por ejemplo: al hueso, hígado, pulmón o cerebro.
- Por lo tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una fusión de anticuerpo de la invención junto con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. También se proporciona el empleo de una proteína de fusión de anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad o trastorno. Más preferiblemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio.
- Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden tomar una forma adecuada para administración oral, bucal, parenteral, subcutánea, nasal, tópica, oftálmica o rectal, o una forma adecuada para administración por inhalación o insuflado.
- Cuando proceda, por ejemplo si el anticuerpo o anticuerpos de un solo dominio de la proteína de fusión de anticuerpo se unen a la albúmina, puede ser deseable preformular la proteína de fusión con doble especificidad con albúmina de suero humana o biotecnológica, empleando cualquier método adecuado conocido en la técnica.
- Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej. almidón de maíz pregelatinizado, polividona o hidroxipropilmetil-celulosa); cargas (p. ej. lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (p. ej. estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej. almidón de patata o glicolato de sodio); o agentes humectantes (p. ej. laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto anhidro para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichos preparados líquidos pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos o conservantes. Los preparados también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes edulcorantes, según proceda.
- Los preparados para administración oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar liberación controlada del compuesto activo.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

5 Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden formularse para administración parenteral por inyección, p. ej. por inyección rápida a emboladas o infusión. Las formulaciones para inyectables pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, p. ej. en ampollas de vidrio o recipientes de múltiples dosis, p. ej. viales de vidrio. Las composiciones para inyectables pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para redisolución con un vehículo adecuado, p. ej. agua estéril exenta de pirógenos, antes de su uso.

10 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los anticuerpos biespecíficos de la invención también se pueden formular como un medicamento de absorción lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación o por inyección intramuscular.

15 Para administración nasal o administración por inhalación, los compuestos según la presente invención pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol para envases presurizados o un nebulizador, con utilización de un gas propulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, fluorotriclorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas o mezcla de gases adecuados.

Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas unitarias de dosificación que contienen el ingrediente activo. El envase o dispositivo dispensador pueden ir acompañados de instrucciones para la administración.

20 Para administración tópica los compuestos según la presente invención pueden formularse convenientemente en una pomada adecuada que contiene el componente activo en suspensión o disuelto en uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Determinados excipientes incluyen, por ejemplo, aceite mineral, vaselina líquida, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, los compuestos según la presente invención se pueden formular en una loción adecuada que contiene el componente activo en suspensión o disuelto en uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Determinados excipientes incluyen, por ejemplo, 25 aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, alcohol bencílico, 2-octildodecanol y agua.

30 Para administración oftálmica los compuestos según la presente invención pueden formularse convenientemente como suspensiones microionizadas en solución salina estéril isotónica con pH ajustado, ya sea con o sin un conservante tal como un agente bactericida o fungicida, por ejemplo nitrato fenilmercurio, cloruro de benzalconio o acetato de clorhexidina. Alternativamente, para administración oftálmica los compuestos pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

35 Para administración rectal los compuestos según la presente invención pueden formularse convenientemente como supositorios. Estos pueden prepararse mezclando el componente activo con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y por lo tanto se fundirán en el recto para liberar el componente activo. Dichos materiales incluyen, por ejemplo, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

40 La cantidad de un compuesto de la invención requerida para la profilaxis o el tratamiento de una afección determinada variará dependiendo del compuesto elegido y del estado del paciente a tratar. En general, sin embargo, las dosis diarias pueden oscilar desde aproximadamente 10 ng/kg a 1.000 mg/kg, por lo general de 100 ng/kg a 100 mg/kg, p. ej., alrededor de 0,01 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal para administración oral o bucal, de alrededor de 10 ng/kg a 50 mg/kg peso corporal para administración parenteral, y desde alrededor de 0,05 mg a alrededor de 1.000 mg, p. ej. de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 1.000 mg, para administración nasal o administración por inhalación o insuflado.

45 Las características preferidas de cada realización de la invención son como para cada una de las demás realizaciones haciendo los cambios necesarios.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no deberían de ninguna manera considerarse restrictivos del alcance de la presente invención.

#### Listado de figuras

50 Figura 1: Representación esquemática de los Fab-dAb en donde el dAb se encuentra en el C terminal

Figura 2: Representación esquemática de los Fab didAb

Figura 3: Análisis por SDS PAGE de FabA-dAbL3 (CK-SG<sub>4</sub>SE) (1) y FabA-dAbL3 (CK-G[APAPA]<sub>2</sub>) (2).

Figura 4: Análisis de transferencia Western de FabA-dAbL3 (CK-SG<sub>4</sub>SE) (1) y FabA-dAbL3 (CK-G[APAPA]<sub>2</sub>) (2).

Figura 4a : SDS PAGE de los FabB-didAb

Banda M = marcadores de SeeBlue

Bandas 1 y 2 = IgG de referencia

Banda 3 = FabB

5 Banda 4 = FabB-didAb, -dAbL1 (CK-G<sub>4</sub>Sx2) y dAbH1 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2)

Banda 5 = FabB-didAb, -dAbL2 (CK-G<sub>4</sub>Sx2) y dAbH2 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2)

Figura 5: Secuencias de anticuerpos de dominio dAbH1, dAbH2, dAbL1 y dAbL2 y las RDC procedentes de cada uno de esos anticuerpos.

10 Figura 6: Construcciones FabB-dAb que comprenden dominio variable FabB de cadena pesada o ligera fusionado a un anticuerpo de dominio.

Figura: Secuencias de cadena pesada y ligera de Fab'A y secuencia de la cadena pesada de FabA.

### Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de un dAb específico para albúmina de suero humano

15 Se produjo una unidad de transcripción codificada por ADN en el marco que codifica un dAb con especificidad para albúmina de suero humano utilizando ingeniería genética.

Cuando se desee una unidad de transcripción codificada por ADN en el marco que codifica un dAb con especificidad para una proteína de selección puede producirse utilizando ingeniería genética.

Ejemplo 2. Producción de fragmentos de anticuerpos

20 Para la fusión de un dAb al C terminal de la cadena ligera, se sintetizó ADN que codifica una región constante de cadena ligera kappa humana (con el alotipo Km3 de la región constante kappa), un ligante peptídico y un dAb y se clonó como un fragmento de restricción SacI- PvuII en el vector de expresión pTTOD (Fab) de la propia empresa UCB-Celltech (derivado de pTTO-1, descrito en Popplewell *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 2005; 308:17-30), que contiene ADN que codifica la región constante gamma-1 CH1 humana. Esto dio lugar a una disposición dicistrónica de gen que consiste en que el gen para la cadena ligera humanizada se fusiona mediante un ligante a un dAb seguido del gen para el fragmento Fab de cadena pesada humanizada, ambos bajo el control del activador tac. También está codificado una zona BspE1 única aguas arriba del ligante Gly4Ser, o una zona AscI aguas arriba del ligante rico en Ala-Pro.

30 Para la fusión de un dAb al C terminal de la cadena pesada, se sintetizó ADN que codifica un fragmento CH1 humano (del isotipo  $\gamma$ 1) seguido de una secuencia codificadora del ligante y un dAb. Esto se subclonó como un fragmento de restricción ApaI-EcoRI en el vector de expresión pTTOD (Fab) de la propia empresa UCB-Celltech (un derivado de pTTO-1, descrito en Popplewell *et al.*, anteriormente), que contiene ADN que codifica la región constante gamma-1 CH1 humana. Esto dio lugar a una disposición dicistrónica del gen que consiste en el gen de la cadena ligera humanizada una secuencia intergénica no codificante y seguido de una cadena pesada fusionada mediante un ligante a un dAb, ambos bajo el control del activador tac. El plásmido de expresión recombinada se transformó en la cepa W3110 de *E. coli* en la que la expresión se produce por adición de IPTG. Se realizaron experimentos de expresión a pequeña escala inicialmente (volúmenes de cultivo de 5 ml) con adición de IPTG 200  $\mu$ M a una D.O. (600 nm) de aprox. 0,5, se recogieron las células 2 horas después de la inducción y se extrajeron durante la noche a 30°C en Tris/EDTA. Los extractos clarificados se utilizaron para análisis de afinidad por Biacore. Para fermentación se seleccionaron Construcciones que dan rendimientos de expresión y actividades prometedoras.

40 Métodos

En los siguientes ejemplos se indica la cadena de anticuerpos a la que se fusiona el dAb ya sea como CK o LC para la cadena ligera cKappa y como CH1 o HC para el dominio constante de cadena pesada, CH1.

Construcción de plásmidos de fusión FabA-dAb para la expresión en *E. coli*

45 Se construyeron proteínas de fusión Fab-dAb fusionando dAbL3 o dAbH4 al C terminal de la región constante de la cadena ligera o pesada de FabA. Se utilizó un ligante flexible (SGGGGSE (SEQ ID n°: 1)) o rígido (G(APAPA)<sub>2</sub> (SEQ ID n°: 34)) para enlazar el dAb a la región cKappa (SEQ ID n°: 75), mientras que el ligante DKTHTS (SEQ ID n°: 2) se utilizó para enlazar el dAb a la región CHI (SEQ ID n°: 76). La secuencia de ADN que codifica la fusión región constante-dAb se preparó por síntesis como fragmentos que permiten la subclonación en la secuencia FabA del vector pTTOD de la propia empresa.

50 Se construyeron fusiones cadena ligera-dAb subclonando el fragmento SacI-ApaI de los genes sintetizados, que

codifica una cKappa en el C terminal fusionada a dAbL3 o dAbH4 mediante un ligante flexible (SGGGGSE (SEQ ID n°: 1)) o rígido (G(APAPA)<sub>2</sub> (SEQ ID n°: 34)), en las zonas correspondientes de un plásmido capaz de expresar FabA. Pesados fusiones de cadena-dAb se construyeron por sub-clonación del fragmento Apal-EcoRI de los genes sintetizados, que codifica un CHI C terminal fusionada a cualquiera dAbL3 o dAbH4 través de un ligante DKTHTS, en los sitios correspondientes de un plásmido capaz de expresar FabA.

5 Fab'A procede de un anticuerpo que se une a IL-1 beta, las secuencias de la cadena pesada y ligera las cuales se proporcionan en las SEQ ID n°: 74 y n° 75 respectivamente como se muestra en la figura 7. En Fab'A donde la cadena ligera tiene un dAb unido, la bisagra de la cadena pesada se alteró a DKTHTS incluso cuando ningún dAb está unido a la cadena pesada (SEQ ID n°: 76).

10 FabA comprende la misma secuencia de cadena ligera (SEQ ID n°: 75) y una secuencia de cadena pesada truncada que termina en la cisteína entre cadenas (SEQ ID n°: 77). dAbL3 y dAbH4 son anticuerpos con dominio de cadena ligera y pesada, respectivamente, que se unen a albúmina de suero humano.

Construcción de plásmidos de fusión FabA-didAb para la expresión en *E. coli*

15 Se construyeron FabA-didAb con dAbL3 o dAbH4 tanto en las cadenas ligeras como pesadas subclonando el fragmento Apal-EcoRI que codifica las fusiones CH1-dAb en los plásmidos Fab-dAb existentes donde el dAb se fusiona a la cadena ligera mediante el ligante flexible.

Construcción de plásmidos de fusión FabB-dAb para la expresión en células de mamífero

20 Los FabB-dAb, FabB-dAbH1 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2), FabB-dAbH2 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2), FabB-dAbL1 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2), FabB-dAbL2 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2) se ensamblaron todos por RCP, a continuación se clonaron en un vector de expresión de mamífero bajo el control del activador HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA. Estos se emparejaron con un vector similar que contenía la cadena ligera de FabB para la expresión en células de mamífero (véase a continuación). FabB procede de un anticuerpo que se une a una molécula coestimuladora de la superficie celular. dAbH1, dAbH2, dAbL1 y dAbL2 se obtuvieron como se describe en el ejemplo 3.

Construcción de plásmidos de fusión FabB-dAb para expresión en células de mamífero

25 Los FabB-dAb, FabB-dAbH1 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2), FabB-dAbH2 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2), FabB-dAbL1 (CK-G<sub>4</sub>Sx2), FabB-dAbL2 (CK-G<sub>4</sub>Sx2) se ensamblaron todos por RCP, a continuación se clonaron en un vector de expresión de mamífero bajo el control del activador HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA.

Expresión en mamíferos de FabB-dAb y didAb

30 Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de cadena pesada y ligera utilizando reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron 2 µg de plásmido de cadena pesada + 2 µg del plásmido de cadena ligera con 10 µl de 293fectin + 340 µl de medio Optimem durante 20 minutos a t. a. La mezcla se añadió a continuación a 5×10<sup>6</sup> células HEK293 en suspensión y se incubó durante 4 días con agitación a 37°C.

Biacore

35 Las afinidades y los parámetros cinéticos para las interacciones de las Construcciones Fab-dAb de unión se determinaron por resonancia de plasmones superficiales (SPR) llevada a cabo en un Biacore T100 empleando chips detectores CM5 y tampón corriente HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% v/v de tensioactivo P20). Se capturaron muestras de Fab-dAb para la superficie del chip detector utilizando un Fab de cabra específico para F(ab')<sub>2</sub> humano (Jackson ImmunoResearch, 109-006-097) o un anticuerpo monoclonal CH1 antihumano generado en la propia empresa. La inmovilización covalente del anticuerpo de captura se consiguió mediante la química de acoplamiento de aminos convencional.

45 Cada ciclo de ensayo consistió en capturar en primer lugar el Fab-dAb empleando 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 hizo el seguimiento de la disociación durante 5 min. Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con 2 inyecciones de 1 min de HCl 40 mM seguido por 30 s de NaOH 5 mM. Los caudales utilizados fueron 10 µl/min para la captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación y 10 µl/min para la regeneración.

Para los ensayos cinéticos, se llevó a cabo una valoración de antígenos (para albúmina de suero humano normalmente 62,5 nM-2 µM, para IL-1β 1,25-40 nM), se usó una celda de flujo con el blanco para la sustracción de referencia y se incluyeron inyecciones de tampón-blanco para sustraer el ruido y la desviación del instrumento.

50 Se determinaron parámetros cinéticos por ajuste global simultáneo de los sensogramas resultantes a un modelo de unión 1:1 patrón usando el programa informático T100 Evaluación de Biacore. Con el fin de probar la unión simultánea, se inyectaron inyecciones de 3 min por separado de HSA 5 µM, IL-1β 100 nM o una solución mixta de HSA 5 µM e IL-1β 100 nM sobre el Fab-dAb capturado.

Purificación de Fab-dAb de *E. coli*

Extracción periplásmica

5 Sedimentos celulares de *E. coli* que contienen los Fab-dAb en el periplasma se volvieron a poner en suspensión en un volumen de cultivo original con Tris/HCl 100 mM, EDTA 10 mM pH 7,4. Estas suspensiones se incubaron a continuación a 4°C durante 16 horas a 250 rpm. Los sedimentos celulares en suspensión se centrifugaron a 10.000 x g durante 1 hora a 4°C. Los sobrenadantes se retiraron y filtraron a 0,45 µm.

Captura de proteína G

10 Se capturaron los Fab-dAb del sobrenadante filtrado por cromatografía de proteína G. En resumen, se aplicaron los sobrenadantes, con un tiempo de residencia de 20 minutos, a una columna GammaBind Plus Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,1. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,1 y el material ligado se eluyó con glicina 0,1 M/HCl pH 2,8. Se recogió el pico de elución y se ajustó el pH a ~pH5 con acetato de sodio 1M. Las eluciones con pH ajustado se concentraron y se diafiltraron en pH 4,5 de acetato de sodio 50 mM usando una membrana 10 k MWCO.

Intercambio iónico

15 Se purificaron más los Fab dAb por cromatografía de intercambio catiónico a pH 4,5 con un gradiente de elución de NaCl. En resumen, los eluidos de Protein-G diafiltrados se aplicaron a una columna Source15S (GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 50 mM pH 4,5. La columna se lavó con acetato de sodio 50 mM pH 4,5 y el material ligado se eluyó con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna desde 0 a 1 M de NaCl en acetato de sodio 50 mM pH 4,5. Las terceras fracciones de volumen de columna se recogieron en todo el gradiente. Las fracciones se analizaron por A280 y SDS-PAGE y se agruparon las fracciones relevantes.

Filtración en gel

25 Si es necesario los Fab dAb se purificaron más por filtración en gel. En resumen, las fracciones reunidas de la elución de intercambio iónico FabA-dAbL3 (CK-SG<sub>4</sub>SE) se aplicaron a una columna Superdex200 (GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 50 mM, NaCl 125 mM pH 5,0 y se eluyó con un gradiente isocrático de acetato de sodio 50 mM, NaCl 125 mM pH 5,0. Se recogieron fracciones de 1/120 del volumen de la columna en todo el gradiente. Las fracciones se analizaron por A280 y SDS-PAGE y se agruparon las fracciones relevantes. Para las Fab-dAb que no se sometieron a filtración en gel, las fracciones de elución de intercambio iónico reunidas se concentraron y se diafiltraron en acetato de sodio 50 mM, NaCl 125 mM pH 5,0 usando una membrana 10 k MWCO.

SDS-PAGE

30 Las muestras se diluyeron con agua cuando era necesario y a continuación a 10 µl se añadieron 2 veces 10 µl de muestra de tampón corriente. Para las muestras no reducidas, se añadieron 2 µl de NEM 100 mM en este momento, para muestras reducidas se añadieron 10 veces 2 µl de agente reductor. La muestra se agitó intensamente, se incubó a 85°C durante 5 minutos, se enfrió y se centrifugó a 12.500 rpm durante 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron en un gel de 4-20% de acrilamina Tris/Glicina SDS y se ejecutaron durante 100 min a 125 V. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF para inmunotransferencia Western o se tiñeron con tinte de proteínas azul de Coomassie.

Inmunotransferencia Western

40 Los geles se transfirieron a membranas de PVDF en Tris 12 mM, glicina 96 mM pH 8,3 durante 16 horas a 150 mA. La membrana de PVDF se bloqueó durante 1 hora con 2% de Marvel™ en PBS + 0,1% de Tween 20 (tampón de bloqueo).

*Anti-cadena ligera*

Anti-cadenas ligeras kappa humanas en HRP-conejo, dilución 1/5.000 en tampón de bloqueo durante 1 h.

*Anti-cadena pesada*

45 Anti-cadena pesada humana en ratón, dilución 1/7.000 en tampón de bloqueo durante 1 h. Seguido de anti-ratón en HRP-cabra, dilución 1/2.000 en tampón de bloqueo durante 1 h.

*Etiqueta anti-His*

anti-His6 de conejo, dilución 1/1000 en tampón de bloqueo durante 1 h. Seguido de anti-IgG de conejo en HRP-cabra, dilución 1/1.000 en tampón de bloqueo durante 1 h.

50 Todas las transferencias se lavaron 6 veces con 100 ml de PBS + 0,1% de Tween20 durante 10 minutos por lavado. Las transferencias se revelaron con reactivo ECL durante 1 min antes de exponer a Amersham Hyperfilm, o reactivo



DAB mejorado con metal durante 20-30 minutos, seguido de agua.

HPLC en fase inversa a alta temperatura

Se analizaron muestras (2 g) en una columna C8 Poroshell de 2,1 mm a 80°C, con un caudal de 2 ml/min y un gradiente de 18-38% de B durante 4 minutos.

- 5           A = 0,1% de TFA en H<sub>2</sub>O  
             B = 0,065% de TFA en 80:20 IPA:MeOH

La detección es por absorción a 214 nm.

ELISA

- 10       Los rendimientos de Fab-dAb se midieron usando un ELISA de tipo sándwich. En resumen, el Fab-dAb se capturó con un anticuerpo anti-CH1, a continuación se reveló con un anti-kappa-HRP.

Ejemplo 3

Generación de anticuerpos anti-albúmina

- 15       ½ conejos lop se inmunizaron con albúmina de suero humano chromapure biotecnológica (adquirida en Jackson). Los conejos recibieron 3 inmunizaciones de 100 µg de proteína HSA por vía subcutánea, la primera inmunización en adyuvante completo de Freund y las inmunizaciones siguientes en adyuvante incompleto de Freund. Se aislaron los anticuerpos 1 y 2 que se unen a albúmina de suero humano, de ratón y de rata utilizando los métodos descritos en el documento WO04/051268. Los genes para el dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de los anticuerpos 1 y 2 se aislaron y secuenciaron después de la clonación por RCP de transcripción inversa.

- 20       Las secuencias de cadena ligera injertadas se subclonaron en el vector de expresión pVRbck de la cadena ligera de conejo que contiene el ADN que codifica la región constante C-Kappa de conejo. Las secuencias de cadena pesada injertadas se subclonaron en el vector de expresión pVRbHFab de la cadena pesada de conejo, que contiene el ADN que codifica la región constante de la cadena pesada de Fab' de conejo. Los plásmidos se cotransfectaron en células CHO y los anticuerpos producidos se seleccionaron para unión y afinidad a la albúmina (Tabla 1). Se realizaron transfecciones de células CHO empleando el procedimiento de Lipofectamine™ 2000 según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, nº de Catálogo 11668).

Generación de anticuerpos con dominio humanizado dAbL1, dAbH1, dAbL2 y dAbH2

- 30       Se diseñaron regiones VL y VH humanizadas utilizando marcos aceptores de la región V humana y restos del donante en las regiones del marco. Una región VL injertada (L1 (SEQ ID nº: 53) y L2 (SEQ ID nº: 55)) y una región VH (H1 (SEC ID nº: 52) y H2 (SEQ ID nº: 54)) se diseñaron para cada uno de los anticuerpos 1 y 2 y los genes se construyeron por ensamblaje de oligonucleótidos y mutagenia por RCP. Los anticuerpos con dominios injertados y sus RDC se muestran en la figura 5.

Tabla 1: Afinidades de anticuerpos anti-albúmina

	Como Fab de conejo		Como IgG humanizada
	SA humana	SA murina	SA humana
	nM	nM	nM
Anticuerpo 1	0,31	2,6	0,82
Anticuerpo 2	0,33	12	0,13

- 35       Ejemplo 4: Análisis de FabB-dAb expresados en células de mamífero

Se produjeron Construcciones de FabB-dAb como se describe en los métodos y los sobrenadantes de las células HEK293 transfectadas que contienen los FabB-dAb se analizaron directamente en BIAcore.

Se realizó un análisis cinético para evaluar la interacción de HSA con las Construcciones de FabB-dAb. Estos consistieron en dAbL1, dAbH2 o dAbL3 fusionado al C terminal de CH1 de FabB (véase la figura 6). El FabB-dAbL1

tiene una mayor afinidad por HSA,  $K_D = 170$  nM, que FabB-dAbL3,  $K_D = 392$  nM. Se demostró que FabB-dAbH2 posee la menor afinidad hacia HSA,  $K_D = 1.074$  nM, véase la Tabla B.

Tabla 2

Construcción	$k_a$ ( $\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ )	$K_D$ ( $\times 10^{-9} \text{M}$ )
FabB-dAbL1 (CH1-G <sub>4</sub> Sx2)	1,91 ± 0,74	2,18 ± 1,21	<b>170 ± 78</b>
FabB-dAbH2 (CH1-G <sub>4</sub> Sx2)	2,66 ± 0,39	29 ± 4,76	<b>1074 ± 42</b>
FabB-dAbL3 (CH1-G <sub>4</sub> Sx2)	2,63 ± 0,39	9,87 ± 1,63	<b>392 ± 119</b>

La afinidad y los parámetros cinéticos se determinó para la unión de HSA a los FabBs fusionados a dAbL1, dAbH2 o dAbL3. Los datos mostrados son los valores medios ± SEM. (Para FabB-dAbL1 y FabB-dAbH2 n = 4. Para FabB-dAbL3 n = 2).

- 5 La afinidad y los parámetros cinéticos se determinó para la unión de HSA a los FabBs fusionados a dAbL1, dAbH2 o dAbL3. Los datos mostrados son los valores medios ± SEM. (Para FabB-dAbL1 y FabB-dAbH2 n = 4. Para FabB-dAbL3 n = 2).

SDS-PAGE y la inmunotransferencia Western de las proteínas FabB-dAb confirmaron que los FABB-dAb producidos eran del tamaño esperado.

- 10 Ejemplo 5: Análisis de los FabB-didAb expresados en células de mamífero

Se produjeron Construcciones de FabB-didAb como se describe en los métodos y los sobrenadantes de las células HEK293 transfectadas que contienen los didAb se analizaron directamente en BIAcore.

- 15 Se realizó un análisis más utilizando Construcciones de didAb en el que dAb únicos se fusionaron a terminales C de Fab tanto de cadena pesada como de cadena ligera. Las Construcciones en los que el didAb procedía de un emparejamiento de dominio variable pesado y ligero natural presentaban una notable mejora en la afinidad en comparación con el único dAb solo (tabla 2 y 3). La fusión didAb que consta de dos dAbL1s idénticos no presentaba ninguna mejora en la afinidad sobre la que se observa para el único dAbL1 (datos no mostrados).

Tabla 3

Construcción	$k_a$ ( $\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ )	$K_D$ ( $\times 10^{-9} \text{M}$ )
FabB-didAb, -dAbL1 (CK-G <sub>4</sub> Sx2) & dAbH1	1,78	0,16	<b>9</b>
(CH1-G <sub>4</sub> Sx2) FabB-didAb, -dAbL2 (CK-G <sub>4</sub> Sx2) & dAbH2 (CH1-G <sub>4</sub> Sx2)	0,54	0,21	39

- 20 Se determinó la afinidad y los parámetros cinéticos para la unión de HSA a los FabB fusionados tanto a dAbL1 y dAbH1 como a dAbL2 y dAbH2.

SDS-PAGE de las proteínas FabB-didAb confirmó que los FabB-didAb expresaban bien y eran del tamaño esperado (véase la figura 4a). Obsérvese que este gel de SDS PAGE es la proteína completa expresada por la célula.

Ejemplo 6

- 25 Análisis de FabA-dAb purificados

Los plásmidos para la expresión de los Fab-dAb, Fab'A-dAbL3 (CK-SG<sub>4</sub>SE) Fab'A-dAbL3 (CK-G [APAPA]<sub>2</sub>) en *E. coli*, se construyeron como se describe en los procedimientos. Los Fab-dAb se expresaron en el periplasma de la *E. coli* y se purificaron hasta homogeneidad como se describe en los procedimientos. La pureza de los Fab-dAb se evaluó por de HPLC en fase inversa a alta temperatura, SDS-PAGE e inmunotransferencia Western. También se evaluó la unión al antígeno en los Fab dAb por Biacore.

- 30

## HPLC en fase inversa a alta temperatura

La HPLC en fase inversa a alta temperatura se realizó como se describe en los métodos de análisis cuantitativo de todas las especies contenidas en FabA-dAbL3 (CK-SG<sub>4</sub>SE) y FabA-dAbL3 (CK-G[APAPA]<sub>2</sub>). El porcentaje de cada una de las especies presentes se muestra en la Tabla 4.

5 Tabla 4. Cuantificación de las especies presentes en lotes de Fab-dAb

Especie	Fab'A-dAbL3 (CK-SG <sub>4</sub> SE)	Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA] <sub>2</sub> )
1	0,6%	1,8%
2	0,6%	0,0%
3	1,0%	0,3%
4	0,9%	0,8%
Fab-dAb	85,5%	92,9%
Di Fab-dAb	11,5%	4,2%

## SDS-PAGE

10 Se prepararon muestras de Fab-dAb en condiciones no reducidas y reducidas y se introdujeron en un gel como se describe en los procedimientos. El gel estaba teñido con Coomassie. Las características del bandeo cromosómico de ambas muestras de Fab-Dab, Fab'A-dAbL3 (CK-SG<sub>4</sub>SE) y Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA]<sub>2</sub>), corresponden bien con el perfil observado por la HPLC en fase inversa a alta temperatura (figura 3).

## Inmunotransferencia Western

15 Las muestras de Fab-dAb se sometieron a SDS-PAGE no reducida seguida de análisis de inmunotransferencia Western con anticuerpos de anti-cadena ligera y de anti-cadena pesada como se describe en los procedimientos. Esto confirmó que el dAb estaba en la cadena ligera del Fab y que la cadena pesada estaba inalterada en ambas muestras (figura 4). También demuestra que todas las bandas detectadas por SDS PAGE no reducida, teñidas con Coomassie, son productos relacionados con Fab-dAb.

## Biacore

20 Se utilizó análisis cinético por SPR como se describe en los procedimientos para evaluar la unión de la albúmina de suero humano a Fab'A-dAbL3 (CK-SG<sub>4</sub>SE) y Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA]<sub>2</sub>). Los resultados de la Tabla E demuestran que ambas construcciones son capaces de unir albúmina de suero humano con una afinidad similar ( $K_D$ ) de aproximadamente 1  $\mu$ M.

Tabla 5

Construcción	$k_a$ ( $\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$K_D$ ( $\times 10^{-9} \text{M}$ )
Fab'A-dAbL3 (CK- SG <sub>4</sub> SE)	3,44	1,42	<b>411</b>
Fab'A-dAbL3 (CK- G[APAPA] <sub>2</sub> )	9,61	2,85	<b>296</b>

25 El análisis cinético adicional demostró que todas las construcciones de fusión conservaban las características de interacción del FabA original hacia IL-1 $\beta$ , tabla F, con sólo diferencias menores observadas en los parámetros cinéticos y de afinidad.

Tabla 6

Construcción	$k_a$ ( $\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ )	$K_D$ ( $\times 10^{-12} \text{M}$ )
Fab'A-dAbL3 (CK- SG <sub>4</sub> SE)	1,90	4,21	<b>221</b>
Fab'A-dAbL3 (CK- G[APAPA] <sub>2</sub> )	2,17	3,99	<b>184</b>
Fab'A	2,02	6,46	<b>320</b>

5 El potencial de cada montaje para unirse simultáneamente tanto a la albúmina de suero humano como al antígeno de IL-1 $\beta$  se evaluó capturando cada montaje a la superficie del chip detector, antes de realizar cualquiera de las inyecciones de 3 min por separado de 5  $\mu\text{M}$  de albúmina de suero humano o IL-1 $\beta$  100 nM, o una solución mixta tanto de albúmina de suero humano 5  $\mu\text{M}$  como de IL-1 $\beta$  100 nM. Para cada montaje de Fab-dAb la respuesta observada para la solución de HSA/IL-1 $\beta$  combinada era casi idéntica a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes, véase la tabla G. Esto demuestra que los Fab dAb son capaces de la unión simultánea tanto a IL-1 $\beta$  como a la albúmina de suero humano, y que la unión de IL-1 $\beta$  o albúmina de suero humano no inhibe la interacción de la otra. El FabA original se une sólo a IL-1 $\beta$ , con unión insignificante a la albúmina de suero humano.

Tabla 7

Construcción	Analito	Unión (RU)	
Fab'A-dAbL3 (CK- SG <sub>4</sub> SE)	HSA + IL-1 $\beta$	<b>37,6</b>	
	HSA	13,2	<b>(37,9)</b>
	IL-1 $\beta$	24,7	
Fab'A-dAbL3 (CK- G[APAPA] <sub>2</sub> )	HSA + IL-1 $\beta$	<b>61,9</b>	
	HSA	30,7	<b>(63,6)</b>
	IL-1 $\beta$	32,9	
Fab'A	HSA + IL-1 $\beta$	<b>30,3</b>	
	HSA	1,3	<b>(30,0)</b>
	IL-1 $\beta$	28,7	

15 La tabla anterior muestra la respuesta de la unión (RU) vista para cada montaje después de inyecciones por separado de HSA o IL-1 $\beta$ , o la inyección de HSA e IL-1 $\beta$  premezclada. En cada caso la concentración final fue de 5  $\mu\text{M}$  para HSA y 100 nM para IL-1 $\beta$ . La suma de las respuestas individuales de HSA e IL-1 se muestra entre paréntesis.

Ejemplo 7: FabA didAb

Expresión de los FabA-didAb en *E. coli*

20 Las fusiones FabA-dAbs y FabA-didAb que terminan con una etiqueta His6 en el C terminal se expresaron en *Escherichia coli*. Tras la extracción periplásmica, las proteínas de fusión de dAb se purificaron por la etiqueta His6 en el C terminal. La expresión de Fab se analizó por inmunotransferencia Western de un gel no reducido con anticuerpos anti-CH1 y anti-cKappa. FabA-dAb y FabA-didAb se expresaron como proteínas completas y se demostró que reaccionan con ambos reactivos de detección de anticuerpos.

25

Análisis de los FabA-didAb expresados en *E. coli*

5 Se realizó un análisis más para caracterizar la unión de HSA a construcciones de FabA al que se fusionaron uno o más dAb. Los ensayos de unión se llevaron a cabo en una variedad de construcciones en los que dAbL3 o dAbH4 se fusionaron a la cadena ligera o pesada del FabA (para detalles de las construcciones y resumen de los datos de unión véase la Tabla 8). Aunque las construcciones que llevan solamente dAbH4, ya sea en la cadena ligera o pesada, se observó que unen HSA comparativamente con poca afinidad ( $\approx 9 \mu\text{M}$  y  $3 \mu\text{M}$ , respectivamente), se observó unión de mayor afinidad para las construcciones que llevan dAbL3, ya sea como una única fusión (en la cadena ligera o pesada) o asociada con un segundo dAb (dAbL3 o dAbH4) en la cadena opuesta.

Tabla 8

Construcción	$k_a$ ( $\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ )	$K_D$ ( $\times 10^{-9} \text{M}$ )
FabA	-	-	nb
FabA-dAbL3 (LC-SG <sub>4</sub> SE)	4,46	16,2	363
FabA-dAbH4 (LC SG <sub>4</sub> SE)	-	-	9142
FabA-dAbL3 (HC-DKTHTS)	8,24	15,4	187
FabA-dAbH4 (HC-DKTHTS)	-	-	2866
FabA-didAb, -dAbL3 (LC-SG <sub>4</sub> SE) & -dAbL3 (HC-DKTHTS)	3,00	15,1	502
FabA-didAb, -dAbL3 (LC-SG <sub>4</sub> SE) & -dAbH4 (HC-DKTHTS)	4,36	16,3	373

Se determinó la afinidad y los parámetros cinéticos para la unión de HSA a los FabA que llevan dAbL3 o dAbH4 ya sea en la cadena ligera (LC) o la cadena pesada (HC) o en ambos como se indica. No se detectó unión (nu) de HSA al FabA original. La cinética de interacción para la unión de HSA al FabA con (dAbH4 en HC) o (dAbH4 en LC), se determinaron demasiado rápidamente, por lo tanto la afinidad ( $K_D$ ) se determinó a partir de unión en estado estacionario.

10

**Listado de secuencias**

<110> UCB Pharma S.A.  
Humphreys, David P  
15 Dave, Emma

<120> Fusiones de anticuerpos con doble especificidad

<130> G0045-WO01

20

<160> 77

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> ligante

<400> 1

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

35

1

5

ES 2 667 729 T3

<210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> ligante  
  
10 <400> 2  
  
Asp Lys Thr His Thr Ser  
1 5  
  
<210> 3  
15 <211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
20 <223> ligante  
  
<400> 3  
  
Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5  
  
25 <210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
30 <220>  
<223> ligante  
  
<400> 4  
  
35 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser  
1 5 10  
  
<210> 5  
40 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> ligante  
  
45 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural  
  
50 <400> 5  
  
Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser  
1 5 10 15  
  
55 <210> 6  
<211> 13

ES 2 667 729 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> ligante

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (7) .. (7)  
10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<400> 6

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

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

20 <220>  
<223> ligante

<400> 7

25 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> 8  
<211> 11  
30 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> ligante

35 <400> 8

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

40 <210> 9  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> ligante

<400> 9

Ala Thr Thr Thr Gly Ser  
1 5

50 <210> 10

ES 2 667 729 T3

<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> ligante

<400> 10

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

Ser His Lys Ser Pro

10 20

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

<220>  
<223> ligante

20 <400> 11

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

25 <210> 12  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> ligante

<400> 12

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

35 <210> 13  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> ligante

<400> 13

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

50 <210> 14  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial



ES 2 667 729 T3

<220>  
<223> ligante

5 <400> 14

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

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

15 <220>  
<223> ligante

<400> 15

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

20 <210> 16  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> ligante

<400> 16

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

<210> 17  
<211> 12  
35 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> ligante

40 <400> 17

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

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

50 <220>  
<223> ligante

<400> 18

ES 2 667 729 T3

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

Arg Pro

5 <210> 19  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> ligante

<400> 19

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

Thr Thr

15 <210> 20  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> ligante

<400> 20

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr

25 1 5 10 15

Phe Asn

30 <210> 21  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> ligante

<400> 21

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

Pro Ala

40 <210> 22  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>

ES 2 667 729 T3

<223> ligante

<400> 22

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

5 Arg Thr

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> ligante

15 <400> 23

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

Phe Gly

<210> 24

20 <211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> ligante

<400> 24

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

Gly Ala

30

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> ligante

<400> 25

40

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

Asp Leu

ES 2 667 729 T3

<210> 26  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial  
5  
<220>  
<223> ligante  
  
<400> 26  
10  
Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro  
1 5 10 15  
  
Ser Leu  
  
<210> 27  
<211> 18  
15 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> ligante  
20  
<400> 27  
  
Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg  
1 5 10 15  
  
Ile Ser  
  
25 <210> 28  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
30 <220>  
<223> ligante  
  
<400> 28  
  
Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg  
1 5 10 15  
  
35 Pro  
  
<210> 29  
<211> 18  
<212> PRT  
40 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> ligante  
  
45 <400> 29

ES 2 667 729 T3

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

Pro Pro

5 <210> 30  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> ligante  
<400> 30

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

Pro Tyr

15 <210> 31  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> ligante  
<400> 31

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr

25 1 5 10 15

Pro

30 <210> 32  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> ligante  
<400> 32

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

Leu Arg

40 <210> 33  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>

ES 2 667 729 T3

<223> ligante

<400> 33

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

5 Phe Pro

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> ligante

15 <400> 34

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala

1                    5                            10

<210> 35

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> ligante

<400> 35

Pro Pro Pro Pro

1

30 <210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> ligante

<400> 36

40 <210> 37

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala

1                    5

<210> 37

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> ligante

50 <400> 37

ES 2 667 729 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 38  
<211> 18  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> ligante

10 <400> 38

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala

15 <210> 39  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> ligante

<400> 39

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

25 20 25

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

<220>  
<223> ligante

35 <400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu

1 5 10 15

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

40 <210> 41  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

ES 2 667 729 T3

<223> ligante

<400> 41

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

Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr  
5 20 25 30

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> ligante

15 <400> 42

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

<210> 43

20 <211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> ligante

<400> 43

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

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

30 <210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> ligante

<400> 44

40 <210> 45

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Artificial

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



ES 2 667 729 T3

<220>  
 <223> ligante  
 5 <400> 45  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10  
 <210> 46  
 10 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> ligante  
 <400> 46  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 20 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> ligante  
 <400> 47  
 30 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Ser  
 20  
 <210> 48  
 <211> 25  
 35 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ligante  
 40 <400> 48  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 20 25  
 45 <210> 49  
 <211> 21  
 <212> PRT

ES 2 667 729 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> ligante

5 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

10 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (12) .. (12)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

15 <400> 49

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  
20

20 <210> 50  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> ligante

<220>  
<221> característica\_misc

30 <222> (7) .. (7)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>  
<221> característica\_misc

35 <222> (12) .. (12)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>  
<221> característica\_misc

40 <222> (17)..(17)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<400> 50

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  
45 20 25

<210> 51  
<211> 31  
<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> ligante

<220>

<221> característica\_misc

5 <222> (7) .. (7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>

<221> característica\_misc

10 <222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>

<221> característica\_misc

15 <222> (17) .. (17)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>

<221> característica\_misc

20 <222> (22) .. (22)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<400> 51

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  
 25 20 25 30

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> dAbH1

35 <400> 52

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

ES 2 667 729 T3

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 53  
<211> 110  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> dAbL1

10

<400> 53

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

ES 2 667 729 T3

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  
100 105 110

<210> 54  
<211> 120  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> dAbH2

<400> 54

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 Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr  
20 25 30

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

ES 2 667 729 T3

Gly Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys 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 Gly  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 55  
<211> 110  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> dAbL2

10

<400> 55

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

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

ES 2 667 729 T3

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser  
 85 90 95

Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

5 <210> 56  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDRH1 dAbH1  
 <400> 56

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn  
 1 5 10

15 <210> 57  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> CDRH2 dAbH1  
 <400> 57

25 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

30 <210> 58  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDRH3 dAbH1  
 35 <400> 58

ES 2 667 729 T3

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu  
 1                    5                    10

<210> 59  
 <211> 12  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDRL1 dAbL1  
 10 <400> 59

Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser  
 1                    5                    10

15 <210> 60  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> CDRL2 dAbL1  
 <400> 60

Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser  
 25 1                    5

<210> 61  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDRL3 dAbL1  
 35 <400> 61

Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr  
 1                    5                    10

40 <210> 62  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 45 <223> CDRH1 dAbH2  
 <400> 62

Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ala Met Thr  
 1                    5                    10

50 <210> 63  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55



ES 2 667 729 T3

<220>  
<223> CDRH2 dAbH2  
  
<400> 63  
5 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly  
1 5 10 15  
  
<210> 64  
<211> 14  
10 <212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> CDRH3 dAbH2  
15 <400> 64  
  
Gly Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu  
1 5 10  
  
20 <210> 65  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
25 <220>  
<223> CDRL1 dAbL2  
  
<400> 65  
  
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Arg Leu Ala  
30 1 5 10  
  
<210> 66  
<211> 7  
<212> PRT  
35 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> CDRL2 dAbL2  
  
40 <400> 66  
  
Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser  
1 5  
  
<210> 67  
<211> 12  
<212> PRT  
45 <213> Artificial  
  
<220>  
50 <223> CDRL3 dAbL2  
  
<400> 67  
  
Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ala  
1 5 10

ES 2 667 729 T3

<210> 68  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> CH1-dAbH1

10

<400> 68

```

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
      100           105           110

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
      115           120           125

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn
 130           135           140

Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
145           150           155           160

Ile Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala
      165           170           175
    
```

ES 2 667 729 T3

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

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

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln  
210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
225 230

5 <210> 69  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CH1-dAbH2  
<400> 69

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

ES 2 667 729 T3

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 100 105 110

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 115 120 125

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg  
 130 135 140

Tyr Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 145 150 155 160

Ile Gly Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala  
 165 170 175

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

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

Gly Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu Trp Gly  
 210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 225 230

ES 2 667 729 T3

<211> 223  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> CH1-dAbL1

<400> 70

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

10

ES 2 667 729 T3

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
100 105 110

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val  
115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser  
130 135 140

Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
165 170 175

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
180 185 190

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser  
195 200 205

Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
210 215 220

<210> 71  
<211> 223  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CH1-dAbL2

10 <400> 71

ES 2 667 729 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
          100                    105                    110

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val  
          115                    120                    125

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

ES 2 667 729 T3

Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
145 150 155 160

Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys  
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
180 185 190

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser  
195 200 205

Ser Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
210 215 220

<210> 72  
<211> 227  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Ck1-dAbL1

<400> 72

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



ES 2 667 729 T3

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 Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110

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

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

Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 145 150 155 160

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val  
 165 170 175

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 180 185 190

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly  
 195 200 205

Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 210 215 220

Glu Ile Lys  
 225

5 <210> 73  
 <211> 227

ES 2 667 729 T3

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
5 <223> Ck1-dAbL2

<400> 73

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

10

ES 2 667 729 T3

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 Gly Gly Gly Ser  
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu  
115 120 125

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

Ser Ile Gly Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro  
165 170 175

Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile  
180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr  
195 200 205

Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
210 215 220

Glu Ile Lys  
225

5 <210> 74  
<211> 255  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> cadena pesada de Fab' A  
<400> 74

ES 2 667 729 T3

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
1                   5                   10                   15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
                  20                   25                   30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe  
                  35                   40                   45

Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro  
50                   55                   60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu  
65                   70                   75                   80

Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
                  85                   90                   95

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
                  100                   105                   110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe  
                  115                   120                   125

ES 2 667 729 T3

Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 225 230 235 240

Pro Lys Thr Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 245 250 255

<210> 75  
 <211> 235  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cadena ligera de Fab A

10 <400> 75

ES 2 667 729 T3

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Lys Met Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
130 135 140

ES 2 667 729 T3

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Val Gln  
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

5 <210> 76  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> bisagra alterada de cadena pesada de Fab'A  
 <400> 76

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 20 25 30

ES 2 667 729 T3

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe  
 35 40 45

Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu  
 65 70 75 80

Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
 85 90 95

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe  
 115 120 125

Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 180 185 190



ES 2 667 729 T3

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
225 230 235 240

Pro Lys Thr Cys Asp Lys Thr His Thr Ser  
245 250

<210> 77  
<211> 244  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> cadena pesada de Fab A

<400> 77

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe  
35 40 45

ES 2 667 729 T3

Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu  
 65 70 75 80

Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
 85 90 95

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe  
 115 120 125

Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 195 200 205

ES 2 667 729 T3

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
210 215 220

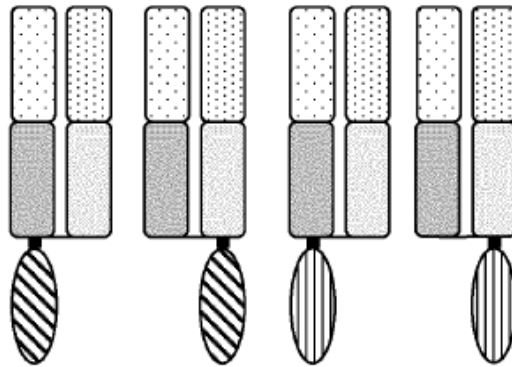
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
225 230 235 240

Pro Lys Thr Cys

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de anticuerpos con doble especificidad que comprende un fragmento Fab o Fab' de anticuerpo con especificidad para un antígeno de interés, estando dicho fragmento genéticamente fusionado a dos anticuerpos de un solo dominio que tienen especificidad para albúmina sérica humana, en donde un anticuerpo de un solo dominio se fusiona al C terminal de la cadena ligera del fragmento Fab o Fab' mediante un ligante y el otro anticuerpo de un solo dominio se fusiona al C terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' mediante un ligante y en donde un anticuerpo de un solo dominio es un dominio VH y el otro anticuerpo de un solo dominio es un dominio VL y los dominios VH y VL son un par VH/VL complementario que se unen al antígeno seleccionado de forma cooperativa y el anticuerpo de un solo dominio VH se fusiona al C terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' y el dominio VL se fusiona al C terminal de la cadena ligera del fragmento Fab o Fab' y
- 5
- 10
- (i) el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:56 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:57 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:58 para CDR-H3 y el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:59 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:60 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:61 para CDR-L3 o
- 15
- (ii) el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:62 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO:63 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO:64 para CDR-H3 y el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:65 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO:66 para CDR-L2 la secuencia dada en SEQ ID NO:67 para CDR-L3.
2. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:52 y el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:53.
- 20
3. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde el dominio VH comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:54 y el dominio VL comprende la secuencia dada en SEQ ID NO:55.
4. Una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cada anticuerpo de un solo dominio está humanizado.
- 25
5. Una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el Fab o Fab' es completamente humano o está completamente humanizado.
6. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde cada anticuerpo de un solo dominio fusionado al fragmento Fab o Fab' se fusiona mediante un ligante independientemente seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos GS, PPP, SEQ ID n°: 1, SEQ ID n°: 2, SEQ ID n°: 3, SEQ ID n°: 4, SEQ ID n°: 5, SEQ ID n°: 6, SEQ ID n°: 7, SEQ ID n°: 8, SEQ ID n°: 9, SEQ ID n°: 10, SEQ ID n°: 11, SEQ ID n°: 12, SEQ ID n°: 13, SEQ ID n°: 14, SEQ ID n°: 15, SEQ ID n°: 16, SEQ ID n°: 17, SEQ ID n°: 18, SEQ ID n°: 19, SEQ ID n°: 20, SEQ ID n°: 21, SEQ ID n°: 22, SEQ ID n°: 23, SEQ ID n°: 24, SEQ ID n°: 25, SEQ ID n°: 26, SEQ ID n°: 27, SEQ ID n°: 28, SEQ ID n°: 29, SEQ ID n°: 30, SEQ ID n°: 31, SEQ ID n°: 32, SEQ ID n°: 33, SEQ ID n°: 34, SEQ ID n°: 35, SEQ ID n°: 36, SEQ ID n°: 37, SEQ ID n°: 38, SEQ ID n°: 39, SEQ ID n°: 40, SEQ ID n°: 41, SEQ ID n°: 42, SEQ ID n°: 43, SEQ ID n°: 44, SEQ ID n°: 45, SEQ ID n°: 46, SEQ ID n°: 47, SEQ ID n°: 48, SEQ ID n°: 49, SEQ ID n°: 50 y SEQ ID n°: 51.
- 30
- 35
7. La proteína de fusión según la reivindicación 6, en donde la secuencia del ligante se selecciona del grupo consistente en la SEQ ID n°: 1, SEQ ID n°: 2, SEQ ID n°: 3 y SEQ ID n°: 45.
8. Un vector de expresión que comprende ADN que codifica una proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad tal como la definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40
9. Una célula anfitriona que comprende un vector tal como el definido en la reivindicación 8.
10. Una proteína de fusión de anticuerpo con doble especificidad según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en terapia.

Figura 1



dAbL o dAbH están unidos al terminal C de la región constante de la cadena ligera o pesada mediante un enlazador (—).







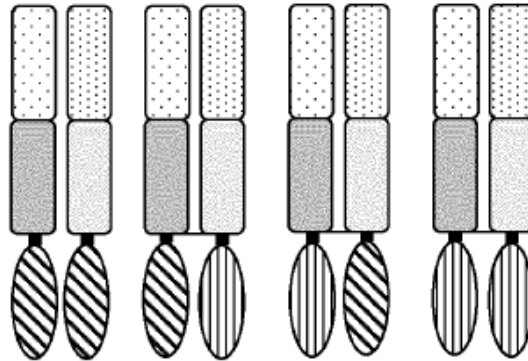



Región variable de cadena ligera  o cadena pesada  . Regiones constantes cKappa  y CH1  . Fragmentos de anticuerpo con dominio dAbL  y dAbH .

Figura 2



dAbL y dAbH están unidos al terminal C de la región constante de cada cadena de modo que una fusión LC-dAbL o LC-dAbH está emparejada con la HC-dAbL o HC-dAbH.

Región variable de cadena ligera  o cadena pesada . Regiones constantes cKappa 




y CH1 . Fragmentos de anticuerpo con dominio, dAbL  y dAbH. 

Figura 3

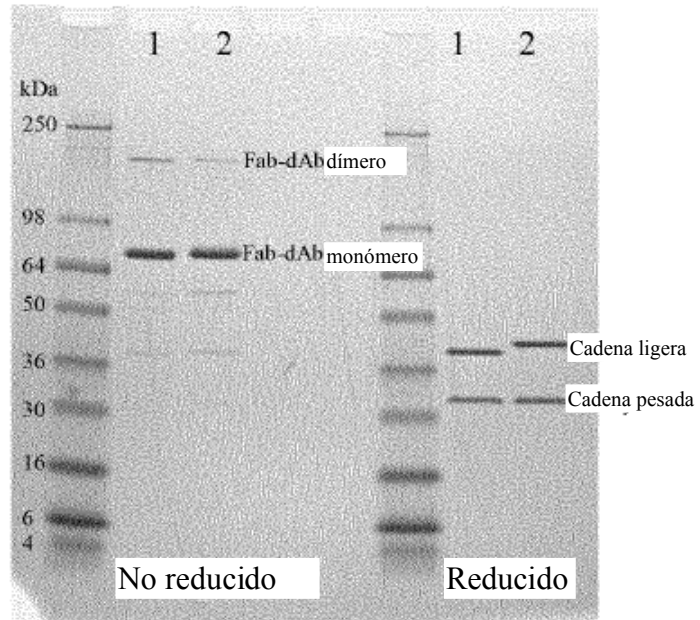


Figura 4

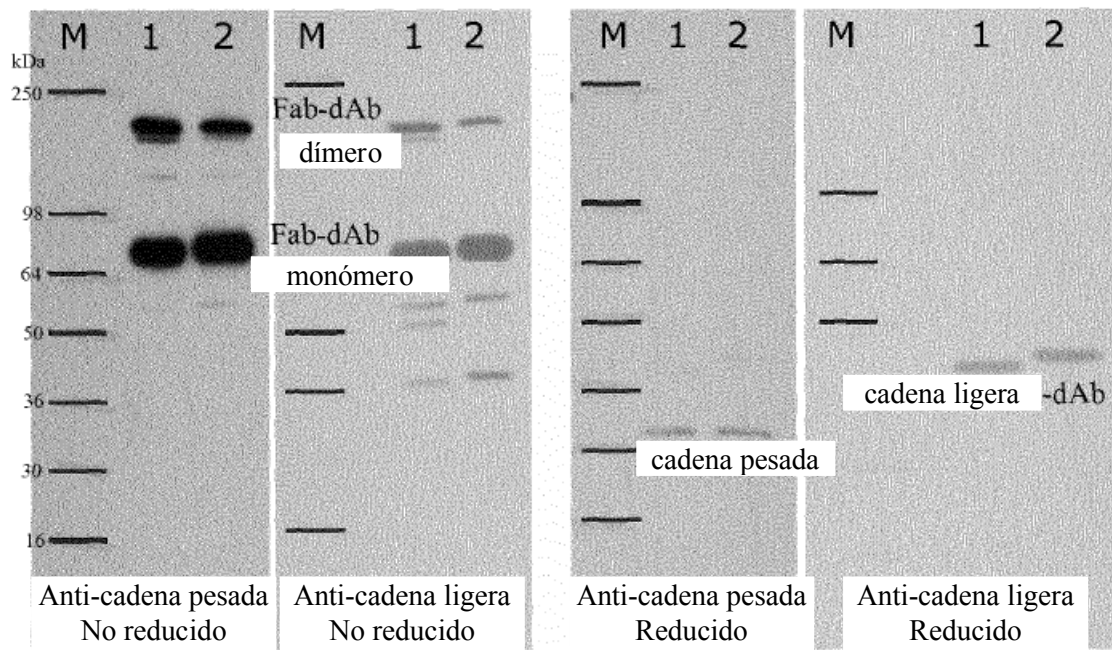
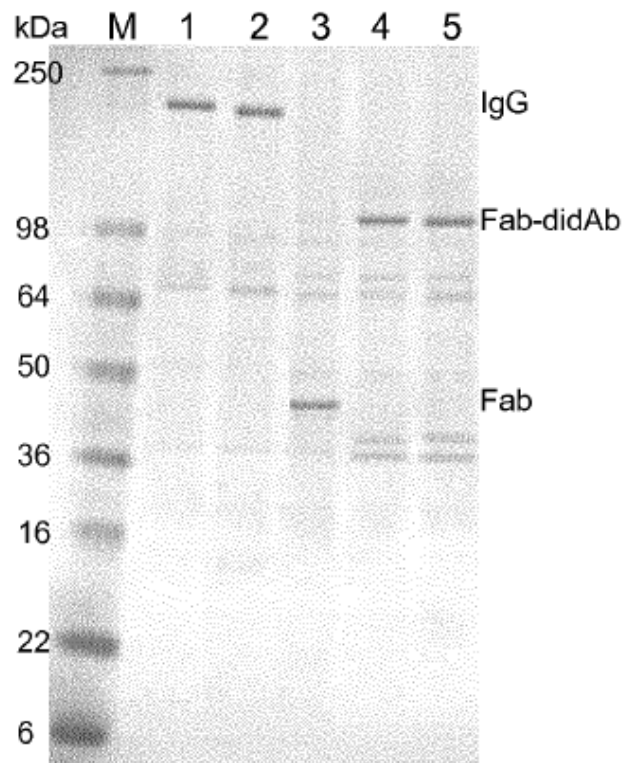




Figura 4a



**Figura 5**

**a) dAbH1**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIWA  
SGTTFYATWAKGRFTISRSTTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPY  
FDLWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:52)

**b) dAbL1**

DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEAS  
KLTSGVPSRFKSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKV  
EIK (SEQ ID NO:53)

**c) dAbH2**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSRyamTWVRQAPGKGLEWIGTIT  
TGGNTNYANWAKGRFTISKDSTTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYVSYA  
DATELSLWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:54)

**d) dAbL2**

DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSRlawYQQKPGKAPKLLIYYAST  
VASGVPSRFKSGSGTDFLTITSLQPDFATYYCQSYDYSSSSSYAFGGGTKV  
EIK (SEQ ID NO:55)

**dAbH1**

- e) CDRH1:       GIDLSNYAIN (SEQ ID NO:56)
- f) CDRH2:       IHWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO:57)
- g) CDRH3:       TVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO:58)

**dAbL1**

- h) CDRL1:       QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO:59)
- i) CDRL2:       EASKLTS (SEQ ID NO:60)
- j) CDRL3:       GGGYSSISDTT (SEQ ID NO:61)

**dAbH2**

- k) CDRH1:       GFSLSRyamT (SEQ ID NO:62)
- l) CDRH2:       TITGGNTNYANWAKG (SEQ ID NO:63)
- m) CDRH3:       GGYVSYADATELSL (SEQ ID NO:64)

**dAbL2**

- n) CDRL1:       QASQSIGSRla (SEQ ID NO:65)
- o) CDRL2:       YASTVAS (SEQ ID NO:66)
- p) CDRL3:       QSYDYSSSSSYA (SEQ ID NO:67)

**Figura 6**

**FabB-dAbH1 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2)**

FABB-DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG  
GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGL  
EWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDTSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTV  
PGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:68)

**FabB-dAbH2 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2)**

FABB-DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG  
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGFSLRYAMTWVRQAPGKG  
LEWIGTITGGNTNYANWAKGRFTISKDSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  
GGYVSYADATELSLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:69)

**FabB-dAbL1 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2)**

FABB-DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG  
GSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRVTTITCQSSPSVWSNFLSWYQKPKGKAP  
KLLIYEASKLTSQVPSRFRKGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTT  
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:70)

**FabB-dAbL2 (CH1-G<sub>4</sub>Sx2)**

FABB-DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG  
GSGGGGSDIVMTQSPSTLSASVGDRVTTITCQASQSIGSR LAWYQKPKGKAPKL  
LIYYASTVASGVPSRFRKGS GSGTEFTLTISSLQPD F ATYYCQSYDYSSSSSYA  
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:71)

**FabB-dAbL1 (CK-G<sub>4</sub>Sx2)**

FABB-DOMINIO VARIABLE DE CADENA LIGERA +

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
ECGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRVTTITCQSSPSVWSNFLSWYQK

**Figura 6 continuación**

PGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYS  
SISDTTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:72)

**FabB-dAbL2 (CK-G<sub>4</sub>Sx2)**

FABB-DOMINIO VARIABLE DE CADELA LIGERA +

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG  
ECGGGGSGGGGSDIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSRLAWYQQKP  
GKAPKLLIYYASTVASGVPSRFKGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQSYDYS  
SSSSYAFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:73)

**Figura 7:****Cadena pesada de FabA**

MKKTAAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTS  
 GVGVGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL  
 QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP  
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTCDKTHTCP CPA (SEQ  
 ID NO:74)

**Cadena ligera de FabA**

MKKTAAIAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNY  
 LSWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATY  
 YCQQGKMLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF  
 YPREAKVQWKVDNAVQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:75)

**Cadena pesada de FabA (enlazador bisabrá modificado)**

MKKTAAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTS  
 GVGVGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL  
 QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP  
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTCDKTHTS (SEQ ID  
 NO:76)

**Cadena pesada de FabA**

MKKTAAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTS  
 GVGVGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL  
 QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP  
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTC (SEQ ID NO:77)