

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 151**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013 PCT/EP2013/054223**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13128027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013 E 13716734 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2820047**

54 Título: **Moléculas de unión de polipéptidos de larga duración**

30 Prioridad:

01.03.2012 US 201261605681 P
02.03.2012 US 201261606268 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.09.2018

73 Titular/es:

AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (100.0%)
Staffelseestrasse 2
81477 München, DE

72 Inventor/es:

KUFER, PETER;
RAUM, TOBIAS;
LUTTERBUESE, RALF;
HOFFMANN, PATRICK;
MUENZ, MARKUS;
BROZY, JOHANNES y
KVESIC, MAJK

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 680 151 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

Moléculas de unión de polipéptidos de larga duración

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de unión, que son anticuerpos biespecíficos, que comprenden al menos tres dominios de unión comprendidos en una cadena de polipéptidos, donde el primer dominio de unión es un dominio de unión que se une a una molécula de superficie celular en una célula diana, el segundo dominio de unión es un dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T, y el tercer dominio es un dominio de unión que se une a seroalbúmina, donde dicho tercer dominio se posiciona en el extremo C de dicho segundo dominio, y donde los tres dominios están en un polipéptido en orden desde el extremo N hasta el extremo C: primer dominio de unión; segundo dominio de unión; y tercer dominio de unión. Asimismo, la invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos biespecíficos, vectores que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico y células huésped transformadas o transfectadas con dichos vectores. Además, la invención proporciona procesos para la producción de los anticuerpos biespecíficos de la invención, usos médicos de dichos anticuerpos biespecíficos y kits que comprenden dichos anticuerpos biespecíficos.

20 Antecedentes de la invención

Por lo general, una mayor vida media es útil en aplicaciones *in vivo* de inmunoglobulinas, especialmente de anticuerpos y más especialmente de fragmentos de anticuerpos de tamaño reducido. Es probable que dichos fragmentos (Fv, Fv con enlaces disulfuro, Fab, scFv, dAb) sufran rápido aclaramiento del cuerpo; por lo tanto, si bien pueden alcanzar la mayoría de las partes del cuerpo con rapidez, y son de rápida producción y más fáciles de manipular, sus aplicaciones *in vivo* pueden estar limitadas por su breve continuidad *in vivo*.

Las moléculas biespecíficas tales como anticuerpos (acopladores biespecíficos de linfocitos T) BiTE® son constructos de proteína recombinante hechos a partir de dos anticuerpos monocatenarios enlazados de manera flexible (scFv). Un scFv de anticuerpos BiTE® es específico para un antígeno superficial asociado a tumor seleccionado sobre células diana; el segundo scFv es específico para CD3, una subunidad del complejo receptor de linfocitos T en linfocitos T. Se conocen las moléculas biespecíficas dirigidas contra CD3 por un lado, y PSMA por otro, p. ej. de la publicación internacional WO 2010/037836 A2, contra CD19, EpCAM, CEA, CD33, EGFR, Her2 y MCSP p. ej. de Bauerle et al. (BAEUERLE PATRICK A ET AL: «BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy» CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS vol. 11, 2009, páginas 22-30), contra EpCAM de Wolf et al. (WOLF E ET AL: «BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity», Drug Discovery Today, Volumen 10, N.º 18, septiembre 2005) y contra CD4 p. ej. de Traunecker et al. (TRAUNECKER A ET AL: «Janusin: new molecular design for bispecific reagents». INTERNAT J CANCER. SUPPLEMENT 1992, vol. 7, páginas 51-52). Por su diseño particular y unión bivalente, los anticuerpos BiTE® son, en especial, aptos para unir transitoriamente linfocitos T a células diana y, al mismo tiempo, activar de manera potente el potencial citolítico inherente de linfocitos T contra células diana. Las moléculas BiTE® son pequeñas proteínas con un peso molecular por debajo del valor de corte renal que podría probablemente dar como resultado una vida media más breve, un

rasgo que las BiTE® comparten con muchos otros formatos de anticuerpo. En realidad, si bien por un lado es deseable tener una molécula de unión pequeña, puesto que, por ejemplo, puede alcanzar rápidamente su ubicación designada en el cuerpo y también puede alcanzar la mayoría de las partes del cuerpo, el «tamaño» de dicha molécula de unión no es favorable en cuanto a, en particular, aclaramiento renal. También puede suceder que dicha molécula de unión sea degradada más rápidamente, puesto que no tiene, por así decirlo, buena protección natural, a menos que haya sido estabilizada antes, por ejemplo, mediante cambios de aminoácidos. Por lo tanto, se trata de una acción de compensación entre tamaño reducido y aclaramiento renal/estabilidad.

En consecuencia, es deseable disponer de una molécula de unión, en particular, una molécula de unión biespecífica mejorada en cuanto a su estabilidad y/o retrasada en cuanto a aclaramiento renal, teniendo de este modo una mayor vida media de suero en general, pero de manera ventajosa todavía tan pequeña que se puede fabricar con buen rendimiento y/o manipular de manera conveniente.

Resumen la invención

La invención resuelve este problema proporcionando medios y procedimientos en forma de anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio de extensión de vida media que muestra una vida media de suero extendida en comparación con anticuerpos biespecíficos que no comprenden un dominio de extensión de vida media.

Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención proporciona moléculas de unión, que son anticuerpos biespecíficos, que comprenden al menos tres dominios de unión consecutivos comprendidos en una cadena de polipéptidos, donde

- (a) el primer dominio de unión es un dominio que se une a una molécula de superficie celular en una célula diana;
- (b) el segundo dominio de unión es un dominio que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T; y
- (c) el tercer dominio de unión es un dominio que se une a seroalbúmina, donde dicho tercer dominio se posiciona en el extremo C de dicho segundo dominio.

En él, los tres dominios están en un polipéptido en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

- primer dominio de unión;
- segundo dominio de unión; y
- tercer dominio de unión.

En una realización de la invención el tercer dominio del anticuerpo biespecífico es un anticuerpo scFv o de dominio único.

En una realización la molécula de unión de la invención es un anticuerpo biespecífico, donde

(a) el primer dominio de unión se puede unir a la molécula de superficie celular en una célula de primate humano y no humano;

5 (b) el segundo dominio de unión se puede unir al complejo receptor CD3 de linfocitos T en una célula de primate humano y no humano, y

(c) el tercer dominio de unión se puede unir a seroalbúmina de primate humano y no humano.

10 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que el tercer dominio de unión que se une a la seroalbúmina se deriva de un banco combinatorio o un dominio de unión a anticuerpo.

En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que el tercer dominio de unión comprende entre 10 y 25 residuos aa.

15 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que el tercer dominio de unión que se une a seroalbúmina comprende la secuencia de aminoácidos Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp, donde Xaa es cualquier aminoácido.

20 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que el tercer dominio de unión que se une a la seroalbúmina se deriva de una CDR de anticuerpo de dominio único.

En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que el tercer dominio de unión se une a seroalbúmina con una afinidad (KD) de ≤ 500 nM.

25 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que la molécula de unión muestra actividad citotóxica en un ensayo *in vitro* que mide la lisis de células diana mediante células efectoras en presencia de seroalbúmina humana al 10 %.

30 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que la molécula consiste en una cadena de polipéptidos única.

En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que

35 (a) el primer dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpos; y/o

(b) el segundo dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpos.

40 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que la molécula comprende uno o más polipéptidos heterólogos adicionales.

En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que el primer dominio de unión que se une a una molécula de superficie celular se une a un antígeno tumoral.

5 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza de una forma en que el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T se puede unir a un epítipo de cadena CD3ε humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo compuesto por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, o 8 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu.

10 En una realización de la invención el anticuerpo biespecífico se caracteriza por una secuencia de aminoácidos como se representa en las SEQ ID NO: 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 75, 76, 81, 82, 85, 86, 90, 91, 85, 96, 100 o 101.

En otro aspecto la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico de la invención.

15 En otro aspecto la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención.

20 En otro aspecto la presente invención proporciona una célula huésped transformada o transfectada con la secuencia de ácido nucleico de la invención o con el vector de la invención.

25 En otro aspecto la presente invención proporciona un proceso para la producción de un anticuerpo biespecífico de la invención, comprendiendo dicho proceso cultivar una célula huésped de la invención en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo biespecífico de la invención y recuperar el anticuerpo biespecífico producido a partir del cultivo.

En otro aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de la invención, o producido de acuerdo con el proceso de la invención.

30 En otro aspecto la presente invención proporciona el anticuerpo biespecífico de la invención, o producido de acuerdo con el proceso de la invención para uso en la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada de entre el grupo compuesto por una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmune.

35 En otro aspecto la presente invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo biespecífico de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula huésped de la invención.

Descripción detallada de la invención

40 Se conoce el modo de acción de los anticuerpos biespecíficos que une a una molécula de superficie celular en una célula diana tal como un antígeno tumoral y al complejo receptor CD3 de linfocitos T. Acercar el linfocito T a una

célula diana, es decir, acoplar dicho linfocito T da como resultado, en esas circunstancias, que el linfocito T destruya a la célula diana. Este proceso se puede aprovechar para combatir una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmune. Por lo tanto, fusionar cualquier elemento tal como secuencias de aminoácidos adicionales al dominio de unión CD3, es decir, al «dominio efector» de una molécula de unión o al dominio de unión diana influye en las propiedades de la molécula de unión de modo que ya no ejercería su función de acoplar apropiadamente un linfocito T y/o unirlo a su diana. De hecho, los linfocitos T están equipados con gránulos que contienen una combinación mortal de proteínas formadoras de poros, llamadas perforinas, y proteasas inductoras de muerte celular, llamadas granzimas. Estas proteínas se suministran al interior de células diana mediante una sinapsis citolítica que solo se puede formar si los linfocitos T están cerca de una célula diana que se ha de destruir. Normalmente, la mayor proximidad entre un linfocito T y una célula diana se consigue uniéndose el linfocito T a un complejo de péptidos/CMH de clase I utilizando su receptor de linfocitos T correspondiente. Incluso, es la función de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención acercar de tal forma un linfocito T a una célula diana en ausencia de interacción de receptor de linfocitos T/CMH. Por ende, cabe pensar que fusionar cualquier elemento tal como secuencias de aminoácidos adicionales a uno o ambos primer y/o segundo dominio de unión de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención podría influir de manera negativa la función de dichos anticuerpos, es decir, acercando una célula diana y un linfocito T para destruir una célula diana.

Siendo así, y teniendo en cuenta que es muy conveniente aumentar la vida media del suero de los anticuerpos biespecíficos para estabilizarlo o evitar el rápido aclaramiento renal y procesos similares, el experto parece encontrarse frente a un dilema. De hecho, si bien un aumento en la vida media podría conseguirse haciendo que un anticuerpo biespecífico se una a, p. ej., seroalbúmina, lo cual requiere equipar dicho anticuerpo biespecífico con un dominio que se pueda unir a seroalbúmina, el agregado de dicho dominio podría probablemente afectar de manera negativa las propiedades de dicho anticuerpo biespecífico, p. ej., podría perder su función o volverse, como mínimo, menos eficaz.

Independientemente de este posible dilema y teniendo en cuenta que un anticuerpo biespecífico de la presente invención podría al menos ser debilitado o incluso desactivado al agregar una unión adicional que se pueda unir a seroalbúmina, los inventores de la presente invención generaron anticuerpos biespecíficos que tienen, además, un primer dominio de unión que se une a una molécula de superficie celular en una célula diana y un segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T, un tercer dominio de unión que se une a seroalbúmina.

La publicación internacional WO 01/45746 que proporciona dominios de unión a seroalbúmina deja completamente a criterio del experto hasta qué extremo de una proteína, en particular un anticuerpo, debería fusionarse un dominio de unión a seroalbúmina; puede ser o bien el extremo N o extremo C y puede depender de las circunstancias. Por consiguiente, la técnica anterior no ofrece apoyo.

Sorprendentemente, han descubierto que el tercer dominio de unión se ha de posicionar en el extremo C del segundo dominio. No cabe duda de que es sorprendente, puesto que muy probablemente se podría esperar que el primer dominio de unión que se une a una molécula de superficie celular en una célula diana podría no ser tan sensible como el segundo dominio que acopla la «función efectora», es decir, un linfocito T mediante unión al

complejo receptor de linfocitos T debido a las razones explicadas anteriormente (formación de una sinapsis y llevar a cabo la destrucción de una célula diana). No obstante, a pesar de esta expectativa, los inventores de la presente invención observaron que agregar un dominio de unión a seroalbúmina al primer dominio de unión (que se une a la célula diana) suprimía la unión del anticuerpo biespecífico.

5 Es más, los anticuerpos biespecíficos de la técnica anterior, tales como diacuerpos con dos dominios de unión, un dominio para CD3 y un segundo dominio para una molécula diana tal como CEA, y equipados con un dominio de unión a seroalbúmina se construyen de tal modo que el dominio de unión a seroalbúmina se fusiona con el dominio que se une a la célula diana; véase Stork et al., Prot Eng Des Sel 20(11), 569-576 (2007) y Mueller et al., J Biol Chem 282(17), 12650-12660 (2007). Por consiguiente, también de la técnica anterior se ha concluido que un dominio de unión a seroalbúmina debería añadirse al dominio que se une a una molécula de superficie celular de célula diana. Se adoptó un enfoque similar en la construcción de anticuerpos DART tal como un ABD-DART (véase la publicación internacional WO 2010/080538, p. ej, Figura 45).

15 Siendo así, los inventores de la presente invención, a pesar de la enseñanza de la técnica anterior y de las expectativas captadas de la enseñanza de la técnica anterior, agregaron un dominio de unión a seroalbúmina al extremo C del segundo dominio de unión que acopla un linfocito T mediante unión al complejo receptor de linfocitos T y consiguieron generar un anticuerpo biespecífico que tiene una vida media de suero mayor, mientras todavía se une a una molécula de superficie celular en una célula diana y al complejo receptor CD3 de linfocitos T, acoplado de este modo el linfocito T de una forma que ejerce las funciones de destruir a la célula diana. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico de la presente invención en el cual los dominios de unión están en el orden que se describe en la presente (véase, p. ej., la reivindicación 1) está mediando citotoxicidad en una célula diana que se produce por el linfocito T acoplado mediante dicho anticuerpo biespecífico.

25 Debido al tercer dominio de unión del anticuerpo biespecífico de la presente invención, un anticuerpo biespecífico de la presente invención tiene preferiblemente una vida media mayor y/o tiempos de continuidad más prolongados en el cuerpo, también proporcionando de este modo una actividad funcional más prolongada del anticuerpo biespecífico.

30 Asimismo, los inventores de la presente invención han observado que un anticuerpo biespecífico de la presente invención también media citotoxicidad *in vitro* en presencia de seroalbúmina al 10 % (v/v), en particular, seroalbúmina humana. Esta es una característica importante, puesto que la seroalbúmina de sangre humana está presente en alrededor de 10-20 % (v/v). En realidad, un anticuerpo biespecífico de la presente invención no se produce de manera natural en un mamífero, en particular en un humano y, por ende, bien podría suceder que la presencia de seroalbúmina pudiera de algún modo perturbar, o interferir con, la acción de un anticuerpo biespecífico de la presente invención.

35 A modo de ejemplo, el ensayo de citotoxicidad *in vitro* en presencia de seroalbúmina, en particular, seroalbúmina humana, se puede utilizar para probar un anticuerpo biespecífico de la presente invención en cuanto a su capacidad de mediación de citotoxicidad.

40

Otra propiedad sorprendente de un anticuerpo biespecífico de la presente invención que tiene el orden (configuración/disposición) de los dominios como se describe en la presente, p. ej. en la reivindicación 1, se puede producir principalmente como monómero. En particular, los inventores de la presente invención descubrieron que más del 80, 85 o incluso 90 % del anticuerpo biespecífico que se puede obtener de células huésped que expresan dicho anticuerpo biespecífico tiene forma de monómero. Esta es una característica importante puesto que no se prefieren dímeros o incluso multímeros por supuestamente haber perdido la mayor parte de su capacidad de unión a una célula diana (mediante una molécula de superficie celular) y/o un linfocito T (mediante el complejo receptor de linfocitos T).

5
10 Cabe señalar que tal como se usa en el presente documento, las formas en singular «un/o», «una» y «el/la» incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a «un reactivo» incluye uno o más de dichos reactivos diferentes y la referencia a «el procedimiento» incluye referencia a etapas equivalentes y procedimientos conocidos para los expertos en la técnica que podrían ser modificados o sustituidos por los procedimientos descritos en la presente memoria.

15
20 A menos que se indique lo contrario, el término «al menos» antes de una serie de elementos se ha de entender como que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente experimentación rutinaria, varios equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes estén comprendidos en la presente invención.

El término «y/o» cuando se lo utilice en la presente invención incluye el significado de «y», «o» y «todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término».

25 Los términos «alrededor» o «aproximadamente» como se usan en la presente memoria significan dentro de 20 %, preferiblemente dentro de 15 %, más preferiblemente dentro de 10 %, y más preferiblemente dentro de 5 % de un valor o intervalo determinado.

30 A lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones que se incluyen a continuación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra «comprender», o variaciones tales como «que comprende» o «comprendiendo», implican la inclusión de un número entero o etapa determinados, o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se lo utiliza en la presente memoria descriptiva, el término «que comprende» se puede sustituir por el término «que contiene» o «que incluye» o a veces cuando se lo utiliza en la presente memoria por el término «que tiene».

35
40 Cuando se lo utiliza en la presente memoria, «compuesto por» excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se lo utiliza en la presente memoria, «compuesto esencialmente por» no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación.

En cada caso en la presente memoria cualquiera de los términos «que comprende», «compuesto esencialmente por» y «compuesto por» se pueden reemplazar por cualquiera de los otros dos términos.

5 El término «anticuerpo biespecífico» en el sentido de la presente descripción indica cualquier molécula capaz de (específicamente) unirse a, interactuar con, o reconocer, la molécula superficial en una célula diana y complejo receptor CD3 en un linfocito T. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos biespecíficos son preferiblemente polipéptidos. Dichos polipéptidos pueden incluir partes proteicas y no proteicas (p. ej. enlazadores químicos o agentes de reticulación químicos tales como glutaraldehído).

10 Un anticuerpo biespecífico, por así decirlo, proporciona la matriz para dicho uno o más dominios de unión de modo que dichos dominios de unión se puedan unir a/interactuar con la molécula superficial en una célula diana y complejo receptor CD3 en un linfocito T. Por ejemplo, dicha matriz podría ser proporcionada por proteína A, en particular, el dominio Z de dicha proteína (aficuerpos), ImmE7 (proteínas de inmunidad), BPTI/APPI (dominios Kunitz), proteína de unión a Ras AF-6 (dominios PDZ), caribdotoxina (toxina de escorpión), CTLA-4, Min-23
 15 (knotinas), lipocalinas (anticalinas), neocarzinostatina, un dominio de fibronectina, un dominio consenso de repetición de anquirina (Stumpp et al., Curr Opin Drug Discov Devel. 10(2), 153-159 (2007)) o tiorredoxina (Skerra, Curr. Opin. Biotechnol. 18, 295-304 (2005); Hosse et al., Protein Sci. 15, 14-27 (2006); Nicaise et al., Protein Sci. 13, 1882-1891 (2004); Nygren y Uhlen, Curr. Opin. Struc. Biol. 7, 463-469 (1997)). Un anticuerpo biespecífico preferido es un anticuerpo, más preferiblemente un anticuerpo biespecífico.

20 El término «antígeno de superficie celular» como se usa en la presente memoria denota una molécula, que se muestra en la superficie de una célula. En la mayor parte de los casos, esta molécula se ubicará dentro o sobre la membrana plasmática de la célula de modo que al menos parte de esta molécula permanezca accesible desde el exterior de la célula en forma terciaria. Un ejemplo no restrictivo de una molécula de superficie celular, que está
 25 ubicada en la membrana plasmática es una proteína transmembrana que comprende, en su conformación terciaria, regiones de hidrofilia e hidrofobia. En la presente memoria, al menos una región hidrofóbica permite que la molécula de superficie celular se incruste o inserte en la membrana plasmática hidrofóbica de la célula mientras que las regiones hidrofílicas se extienden a cada lado de la membrana plasmática dentro del citoplasma y el espacio extracelular, respectivamente. Los ejemplos no restrictivos de las moléculas de superficie celular que están ubicadas
 30 en la membrana plasmática son proteínas que han sido modificadas en un residuo de cisteína para soportar un grupo palmitoílo, proteínas modificadas en un residuo de cisteína en el extremo C-terminal para soportar un grupo farnesilo o proteínas que han sido modificadas en el extremo C para soportar un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI, por su sigla en inglés). Estos grupos permiten la unión covalente de proteínas a la superficie exterior de la membrana plasmática, donde permanecen accesibles para ser reconocidas por moléculas extracelulares tales como
 35 anticuerpos.

El complejo receptor CD3 de linfocitos T es un complejo de proteínas y está compuesto por cuatro cadenas distintas. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , y dos cadenas CD3 ϵ (épsilon). Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de linfocitos T (TCR) y la cadena ζ para generar
 40 una señal de activación en linfocitos T. Un anticuerpo biespecífico de la presente invención se une preferiblemente mediante su segundo dominio a la cadena CD3 ϵ (épsilon) del receptor de linfocitos T.

La lisis redirigida de células diana mediante el reclutamiento de linfocitos T por moléculas biespecíficas implica la formación de sinapsis citolítica y el suministro de perforina y granzimas. Los linfocitos T acoplados son capaces de producir lisis de célula diana en serie, y no son afectados por mecanismos de escape inmunológico que interfieren con el procesamiento y la presentación de antígenos peptídicos o diferenciación de linfocitos T clonales; véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 2007/042261.

El término biespecífico como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un primer y un segundo dominio de unión, donde el primer dominio de unión es capaz de unirse a un antígeno o diana, y el segundo dominio de unión es capaz de unirse a otro antígeno o diana. El «anticuerpo biespecífico» de la invención también comprende anticuerpos biespecíficos multiespecíficos tales como, p. ej., anticuerpos biespecíficos triespecíficos, incluyendo los últimos tres dominios de unión. No obstante, el término «biespecífico» cuando se lo utiliza en la presente memoria en el contexto de anticuerpos biespecíficos de la presente invención no se ha de interpretar como que excluye dominios de unión adicionales con especificidad de unión a moléculas que no sean una molécula de superficie celular en una célula diana y CD3 del anticuerpo biespecífico de la presente invención. Un dominio de unión adicional es el tercer dominio de unión de un anticuerpo biespecífico de la presente invención que es capaz de unirse a seroalbúmina.

Se prevé que el anticuerpo biespecífico de la invención tenga una función adicional, además de su función de unirse a la molécula superficial en una célula diana y al complejo receptor CD3 en un linfocito T y a seroalbúmina. En este formato, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico cuádruple o multifuncional que elige como diana a células plasmáticas uniéndose a una molécula superficial en una célula diana, mediando actividad de linfocito T citotóxico a través de unión a CD3 y proporcionando una función adicional tal como una marcación (fluorescente, etc.) y/o un agente terapéutico tal como, p. ej. una toxina o radionucleido.

El término «dominio de unión» caracteriza en relación con la presente invención un dominio que es capaz de específicamente unirse a / interactuar con un epítipo diana determinado o un sitio diana determinado en la molécula superficial en una célula diana y el complejo receptor CD3 en un linfocito T. Asimismo, el término también puede caracterizar el dominio de unión a seroalbúmina o unido por seroalbúmina.

Los dominios de unión se pueden derivar de un donante de dominio de unión tal como, por ejemplo, un anticuerpo, proteína A, ImmE7 (proteínas de inmunidad), BPTI/APPI (dominios Kunitz), proteína de unión a Ras AF-6 (dominios PDZ), caribdotoxina (toxina de escorpión), CTLA-4, Min-23 (knotinas), lipocalinas (anticalinas), neocarzinostatina, un dominio de fibronectina, un dominio consenso de repetición de anquirina (Stumpp et al., Curr Opin Drug Discov Devel. 10(2), 153-159 (2007)) o tiorredoxina (Skerra, Curr. Opin. Biotechnol. 18, 295-304 (2005); Hosse et al., Protein Sci. 15, 14-27 (2006); Nicaise et al., Protein Sci. 13, 1882-1891 (2004) ; Nygren & Uhlen, Curr. Opin. Struc. Biol. 7, 463-469 (1997)). En el caso de los dominios de unión que se unen a la molécula superficial en una célula diana y al complejo receptor CD3 en un linfocito T, un dominio de unión preferido se deriva de un anticuerpo. Se prevé que un dominio de unión de la presente invención comprenda al menos dicha parte de cualquiera de los dominios de unión antes mencionados que se requieren para unirse a / interactuar con un epítipo diana

determinado o un sitio diana determinado en la molécula superficial en una célula diana y el complejo receptor CD3 en un linfocito T.

5 Se prevé que el dominio de unión de los donantes de dominio de unión antes mencionados esté caracterizado por dicha parte de estos donantes que es responsable de unir la diana respectiva, es decir, cuando dicha parte se elimina del donante de dominio de unión, dicho donante pierde su capacidad de unión. «Perder» significa una reducción de al menos 50 % de la capacidad de unión en comparación con el donante de unión. En la técnica se conocen procedimientos para correlacionar estos sitios de unión; por lo tanto, entra dentro del conocimiento común de un experto en la técnica localizar/correlacionar el sitio de unión de un donante de dominio de unión y, por ende,
10 «derivar» dicho dominio de unión desde los respectivos donantes de dominio de unión.

Los términos «(capaz de) unirse a», «reconoce específicamente», «dirigido a» y «que reacciona con» significan de acuerdo con la presente invención que un dominio de unión es capaz de interactuar específicamente con uno o más, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, y más preferiblemente al menos cuatro
15 aminoácidos de un epítipo.

Como se utiliza en la presente invención, los términos «interactuar específicamente», «unirse específicamente» o «se une específicamente a» significan que un dominio de unión muestra una afinidad apreciable por una proteína o antígeno en particular y, en general, no muestra reactividad significativa con proteínas o antígenos que no sean la
20 molécula superficial en una célula diana y el complejo receptor CD3 en un linfocito T. «Afinidad apreciable» incluye una unión con afinidad de alrededor de 10^{-6} M (KD) o mayor. Preferiblemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es de alrededor de 10^{-11} a 10^{-8} M, preferiblemente de alrededor de 10^{-11} a 10^{-9} M. Si un dominio de unión reacciona de forma específica con o se une a una diana se puede probar con facilidad, entre otros procedimientos, comparando la reacción de dicho dominio de unión con una proteína o antígeno diana con la
25 reacción de dicho dominio de unión con proteínas o antígenos que no sean la molécula superficial en una célula diana y el complejo receptor CD3 en un linfocito T. Preferiblemente, un dominio de unión de la invención no se une esencialmente o no es capaz de unirse con proteínas o antígenos que no sean la molécula superficial en una célula diana y el complejo receptor CD3 en un linfocito T (es decir, el primer dominio de unión no es capaz de unirse con proteínas que no sean esta molécula superficial en una célula diana y el segundo dominio de unión no es capaz de
30 unirse con una proteína que no sea el complejo receptor CD3 en un linfocito T).

Los términos «no se une esencialmente a», «no es capaz de unirse a» significan que un dominio de unión de la presente invención no se une con otra proteína o antígeno que no sea la molécula superficial en una célula diana o el complejo receptor CD3 en un linfocito T, es decir, no muestra reactividad de más de 30 %, preferiblemente más de
35 20 %, más preferiblemente más de 10 %, en particular preferiblemente más de 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % con proteínas o antígenos que no sean la molécula superficial en una célula diana o el complejo receptor CD3 en un linfocito T.

Se cree que la unión específica se produce por motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del dominio de
40 unión y el antígeno. Por lo tanto, la unión se consigue como resultado de su estructura primaria, secundaria y/o terciaria así como también como resultado de modificaciones secundarias de dichas estructuras. La interacción

específica del sitio de interacción de antígeno con su antígeno específico puede dar como resultado una unión simple de dicho sitio al antígeno. Asimismo, la interacción específica del sitio de interacción de antígeno con su antígeno específico puede de manera alternativa o adicional dar como resultado la iniciación de una señal, p. ej. debido a la inducción de un cambio de la conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc.

5 Las proteínas (incluyendo fragmentos de las mismas, preferiblemente fragmentos biológicamente activos, y péptidos, que por lo general tienen menos de 30 aminoácidos) comprenden uno o más aminoácidos acoplados entre sí mediante un enlace peptídico covalente (dando como resultado una cadena de aminoácidos). El término «polipéptido» como se usa en la presente memoria describe un grupo de moléculas, compuesto por más de 30
10 aminoácidos. Además, los polipéptidos pueden formar multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros de orden superior, es decir, compuestos por más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptido que forman dichos dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros son, en consecuencia, denominadas homo o heterodímeros, homo o heterotrímeros, etc. Un ejemplo de heteromultímero es una molécula de anticuerpo que, en su forma natural, está
15 compuesta por dos cadenas de polipéptidos ligeras idénticas y dos cadenas de polipéptidos pesadas idénticas. Los términos «polipéptido» y «proteína» también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados naturalmente donde la modificación se lleva a cabo p. ej. mediante modificaciones postraduccionales como glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Un «polipéptido» cuando se menciona en la presente memoria también puede estar químicamente modificado tal como pegilado. Dichas modificaciones son conocidas en la técnica.

20 El término «epítopo» se refiere a un sitio en un antígeno al cual un dominio de unión, tal como un anticuerpo o inmunoglobulina o derivado o fragmento de un anticuerpo o de una inmunoglobulina, se une de manera específica. Un «epítopo» es antigénico y, por ende, el término «epítopo» a veces también se menciona en la presente memoria como «estructura antigénica» o «determinante antigénico». Por lo tanto, el dominio de unión es un «sitio de
25 interacción de antígeno». Se entiende que dicha unión/interacción también define un «reconocimiento específico». En un ejemplo, dicho dominio de unión que (específicamente) se une a / interactúa con determinado epítopo diana o determinado sitio diana en la molécula superficial en una célula diana y al complejo receptor CD3 en un linfocito T es un anticuerpo o inmunoglobulina, y dicho dominio de unión es una región VH y/o VL de un anticuerpo o de una inmunoglobulina.

30 Los «epítopos» se pueden formar por aminoácidos contiguos o no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Un «epítopo lineal» es un epítopo donde una secuencia primaria de aminoácidos comprende el epítopo reconocido. Un epítopo lineal normalmente incluye al menos 3 o al menos 4, y más comúnmente, al menos 5 o al menos 6 o al menos 7, por ejemplo, alrededor de 8 a alrededor de 10 aminoácidos en una secuencia única.

35 Un «epítopo conformacional», en contraposición a un epítopo lineal, es un epítopo donde la secuencia primaria de los aminoácidos que comprende el epítopo no es el único componente característico del epítopo reconocido (p. ej., un epítopo donde la secuencia primaria de aminoácidos no es necesariamente reconocida por el dominio de unión). Normalmente, un epítopo conformacional comprende una cantidad mayor de aminoácidos en comparación con un
40 epítopo lineal. Con respecto al reconocimiento de epítopos conformacionales, el dominio de unión reconoce una estructura tridimensional del antígeno, preferiblemente un péptido o proteína o fragmento de estos (en el contexto de

la presente invención, el antígeno para uno de los dominios de unión está comprendido dentro de la molécula superficial en una célula diana y el complejo receptor CD3 en un linfocito T). Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, ciertos aminoácidos y/o la estructura principal polipeptídica que forma el epítipo conformacional se yuxtaponen permitiéndole al anticuerpo reconocer el epítipo.

5 Los procedimientos para determinar la conformación de epítopos incluyen, sin carácter restrictivo, cristalografía de rayos X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional (2D-RMN) y marcación rotacional dirigida a sitios y espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE).

10 El término «dominio de unión a albúmina» (ABP) caracteriza un motivo de secuencia dentro del anticuerpo específico de la invención que media una unión específica a seroalbúmina desde múltiples especies con alta afinidad.

En la Tabla 1 se muestran ejemplos no restrictivos de ABP.

15

Tabla 1: Ejemplos no restrictivos de motivos de ABP

Péptido	Secuencia
SA04	DICLPRWGCLW
SA08	QGLIGDICLPRWGCLWGDSVK
SA21	RLIEDICLPRWGCLWEDD
SA25	EDICLPRWGCLWED
DX236	AEGTGDFWFCDRIAWYPQHLCEFLDPE
DX321	AEGTGDRNMCKFSWIRSPAFCARADPE
AB01	AASYSDYDVFGGGTDFGP
AB14	AARYWDYDVFGGGTPVGG
AB156	AARDWDFDVFGGGTPVGG

5 En los anticuerpos biespecíficos de la invención los tres dominios están en un polipéptido en orden desde el extremo N hasta el extremo C:

- primer dominio de unión;
- segundo dominio de unión; y
- tercer dominio de unión.

10 Asimismo, en una realización de la invención el tercer dominio de unión del anticuerpo biespecífico de la invención es un anticuerpo scFv o de dominio único.

15 En un aspecto, el anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende tres dominios de unión, donde

(a) el primer dominio de unión es un dominio que se puede unir a la molécula de superficie celular en una célula de primate humano y no humano;

20 (b) el segundo dominio de unión es un dominio que se puede unir al complejo receptor CD3 de linfocitos T en una célula de primate humano y no humano, y

(c) el tercer dominio de unión es un dominio que se puede unir a seroalbúmina de primate humano y no humano.

25 El término «primate no humano» caracteriza el grupo de todas las especies del orden de los primates excluyendo humanos. Por lo tanto, el grupo comprende explícitamente las familias Callitrichidae (titíes y tamarinos), Cebidae, Cercopithecidae (monos del viejo mundo), Hylobatidae (monos menores, gibones) y Hominoidea (monos mayores). También se prevé que el tercer dominio de unión sea un dominio que se puede unir a seroalbúmina de primate humano y al menos una de no humano, preferiblemente de Cercopithecidae (monos del viejo mundo). También se prevé que el tercer dominio de unión sea un dominio que se pueda unir a seroalbúmina de primate humano y al menos una de no humano, preferiblemente de Cercopithecidae (monos del viejo mundo) y adicionalmente a una seroalbúmina de roedor, tal como ratón o rata (véase Ejemplo 3).

30

Los términos «especificidad de una especie a otra» o «especificidad entre especies» como se usan en la presente memoria significan unión de un dominio de unión descrito en la presente memoria a la misma molécula diana en primates humanos y no humanos. Por lo tanto, «especificidad de una especie a otra» o «especificidad entre especies» se han de entender como una reactividad entre especies a la misma molécula X expresada en distintas especies, pero no a una molécula que no sea X. La especificidad de una especie a otra de un anticuerpo monoclonal que reconoce, p. ej. CD3 épsilon humana, a CD3 épsilon de primate no humano, p. ej., CD3 épsilon de macaco, puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis FACS. El análisis FACS se lleva a cabo de una forma tal que el anticuerpo monoclonal respectivo se pruebe en cuanto a unión a células de primate humano y no humano, p. ej. células de macaco, que expresan dichos antígenos de CD3 épsilon de primate humano y no humano, respectivamente. En los siguientes ejemplos se muestra un ensayo apropiado.

Para la generación de un dominio de unión para el anticuerpo biespecífico de la invención, p. ej. anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en la presente memoria, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos de superficie celular de primate humano y/o no humano respectivos. Los dominios de unión apropiados para el polipéptido biespecífico como se definen en la presente memoria, por ejemplo, se pueden derivar de anticuerpos monoclonales específicos de una especie a otra mediante procedimientos recombinantes descritos en la técnica. Un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno de superficie celular humano y al homólogo de dicho antígeno de superficie celular en un primate no chimpancé se puede analizar mediante ensayos FACS como se describe más arriba. Es evidente para los expertos en la técnica que los anticuerpos específicos de una especie a otra también se pueden generar mediante técnicas de hibridoma descritas en la bibliografía (Milstein y Köhler, Nature 256 (1975), 495-7). Por ejemplo, los ratones se pueden inmunizar de manera alternativa con antígeno de primate humano y no humano. De estos ratones, las células de hibridoma productoras de anticuerpos específicos de una especie a otra se aíslan mediante tecnología de hibridoma y se analizan con FACS como se indica anteriormente. La generación y análisis de polipéptidos biespecíficos tales como anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad de una especie a otra como se describen en la presente memoria se muestran en los siguientes ejemplos. Las ventajas de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos que muestran especificidad de una especie a otra incluyen los puntos enumerados anteriormente.

Asimismo, en un aspecto del anticuerpo biespecífico de la presente invención, el tercer dominio de unión que se une a seroalbúmina se deriva de un banco combinatorio o un dominio de unión a anticuerpo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término «banco combinatorio» define un banco de moléculas de ácido nucleico, derivado de, por ejemplo, síntesis genética utilizando tripletes de NNS u otros procedimientos conocidos para el experto en la técnica, que codifican para un conjunto inferido de secuencias de aminoácidos que varían en una o más posiciones de aminoácidos con el propósito de seleccionar o cribar moléculas con una funcionalidad específica tal como unión a una proteína de interés.

La definición del término «anticuerpo» incluye realizaciones tales como anticuerpos monoclonales, quiméricos, monocatenarios, humanizados y humanos. Además de anticuerpos de longitud completa, la definición también incluye derivados de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos o

derivados de anticuerpos además comprenden fragmentos F(ab')₂, Fv, scFv o anticuerpos monocatenarios tales como anticuerpos de dominio o nanocuerpos, anticuerpos de dominio variable único o dominio variable único de inmunoglobulina que comprenden simplemente un dominio variable, que puede ser VHH, VH o VL, que específicamente unan un antígeno o epítipo independientemente de otros dominios o regiones V; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit.; Kontermann y Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2ª ed. 2010 y Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009. Dicho término también incluye diacuerpos o anticuerpos de refocalización de moléculas de afinidad dual (DART, por su sigla en inglés). Los dominios variables únicos de inmunoglobulina comprenden no solo un polipéptido de dominio variable único de anticuerpo aislado sino también polipéptidos mayores que comprenden uno o más monómeros de una secuencia de polipéptidos de dominio variable único de anticuerpo.

Se conocen en la técnica diversos procedimientos que se pueden utilizar para la producción de dichos anticuerpos y/o fragmentos. Por lo tanto, los derivados (de anticuerpos) se pueden producir mediante peptidomiméticos. Asimismo, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, entre otros, la patente de Estados Unidos 4.946.778, Kontermann y Dübel (2010), loc. cit. Y Little (2009), loc. cit.) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios específicos para uno o más polipéptidos elegido o elegidos. Además, los animales transgénicos se pueden utilizar para expresar anticuerpos humanizados específicos para polipéptidos y proteínas de fusión de la presente invención. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede emplear cualquier técnica que proporciona anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares. Entre los ejemplos de dichas técnicas se incluyen la técnica de hibridoma (Köhler y Milstein *Nature* 256 (1975), 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). La resonancia de plasmones superficiales como se utiliza en el sistema BIAcore se puede utilizar para aumentar la eficacia de anticuerpos de fagos que se unen a un epítipo de un polipéptido diana, tal como CD3 épsilon (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (183), 7-13). También se prevé en el contexto de esta invención que el término «anticuerpo» comprenda constructos de anticuerpo, que se pueden expresar en un huésped como se describe más adelante en la presente memoria, p. ej. constructos de anticuerpo que se pueden transfectar y/o transducir mediante, entre otros, virus o vectores de plásmido

Asimismo, el término «anticuerpo» como se emplea en la presente memoria también se refiere a derivados o variantes de los anticuerpos descritos en la presente memoria que muestran la misma especificidad que los anticuerpos descritos. Entre los ejemplos de «variantes de anticuerpos» se incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos «madurados por afinidad» (véase, p. ej. Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) y Lowman et al., *Biochemistry* 30, 10832- 10837 (1991)) y mutantes de anticuerpos con función o funciones efectora(s) alterada(s) (véase, p. ej., patente de Estados Unidos 5.648.260, Kontermann & Dübel (2010), loc. cit. y Little(2009), loc. cit.).

Los términos «dominio de unión a antígeno», «fragmento de unión a antígeno» y «región de unión a anticuerpo» cuando se los emplea en la presente memoria se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre anticuerpo y antígeno. La parte del antígeno que

es específicamente reconocida y unida mediante el anticuerpo se refiere como «epítopo» como se describe anteriormente en la presente memoria. Como se indica anteriormente, un dominio de unión a antígeno puede normalmente comprender una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo; no obstante, no comprende ambas. Los fragmentos Fd, por ejemplo, tienen dos regiones VH y por lo general retienen parte de la función de unión a antígeno del dominio de unión a antígeno intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se incluyen (1) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH1; (2) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (3) un fragmento Fd que tiene los dos dominios VH y CH1; (4) un fragmento Fv que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (5) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546), que tiene un dominio VH; (6) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR), y (7) un Fv monocatenario (scFv). Si bien los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite generarse como una cadena de proteína sencilla en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, p. ej. Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica, y los fragmentos se evalúan en cuanto a función de la misma manera que los anticuerpos intactos.

En el caso de que se utilice un enlazador (sintético), este enlazador es preferiblemente de una longitud y secuencia suficiente para asegurar que cada uno del primer y segundo dominio puedan, independientemente uno del otro, retener sus especificidades de unión diferenciales. Más preferiblemente y como se documenta en los ejemplos adjuntos, el constructo de anticuerpo de la invención es un «constructo de anticuerpo monocatenario biespecífico», más preferiblemente, un Fv monocatenario biespecífico (scFv). Las moléculas monocatenarias biespecíficas son conocidas en la técnica y se describen en la publicación internacional WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293,41-56.

Dichos dominios variables comprendidos en los constructos de anticuerpo descritos en la presente memoria pueden estar conectados por secuencias de enlazadores adicionales. El término «enlazador peptídico» define de acuerdo con la presente invención una secuencia de aminoácidos mediante la cual las secuencias de aminoácidos del primer dominio y el segundo dominio del constructo de anticuerpo de la invención se enlazan entre sí. Una característica técnica esencial de dicho enlazador peptídico es que dicho enlazador peptídico no comprende ninguna actividad de polimerización. Los residuos de aminoácidos preferidos para un enlazador peptídico incluyen Gly, Ser y Thr y están caracterizados por una longitud que oscila entre 5 y 25 residuos de aminoácidos. Entre los enlazadores peptídicos apropiados se encuentran los que se describen en las patentes de Estados Unidos 4.751.180 y 4.935.233 o publicación internacional WO 88/09344. Una realización preferida de un enlazador peptídico se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, es decir Gly₄Ser, o polímeros de estos, es decir, (Gly₄Ser)_x, donde x es un número entero 1 o mayor. Las características de dicho enlazador peptídico, que comprenden la ausencia de la promoción de estructuras secundarias son conocidas en la técnica y se describen, p. ej., en Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) y Raag y Whitlow (FASEB (1995)

9(1), 73-80). Se prefieren los enlazadores peptídicos que además no promocionan ninguna estructura secundaria. El enlazamiento de dichos dominios entre sí se puede proporcionar mediante, p. ej. ingeniería genética, como se describe en los ejemplos. Los procedimientos para preparar constructos monocatenarios biespecíficos fusionados y enlazados de manera operativa y expresarlos en células de mamífero o bacterias son conocidos en la técnica (p. ej. publicación internacional WO 99/54440 o Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

Para enlazadores peptídicos, que conectan los al menos dos dominios de unión en el constructo de anticuerpo de la invención, se prefieren enlazadores peptídicos que solo comprenden pocos residuos de aminoácidos, p. ej. 12 residuos de aminoácidos o menos. Por lo tanto, se prefieren enlazadores peptídicos de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 residuos de aminoácidos. Un enlazador peptídico previsto con menos de 5 aminoácidos comprende 4, 3, 2 o 1 aminoácido(s) donde se prefieren los enlazadores ricos en Gly. Un aminoácido «único» particularmente preferido en el contexto de dicho «enlazador peptídico» es Gly. Por consiguiente, dicho enlazador peptídico puede estar compuesto por el aminoácido único Gly.

El término «anticuerpo monoclonal» como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que ocurren de manera natural y/o modificaciones postraduccionales (p. ej. isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un sitio antigénico único. Asimismo, a diferencia de preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que normalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que son sintetizados por el cultivo de hibridomas, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador «monoclonal» indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se han de utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden producir mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Los «anticuerpos monoclonales» también se pueden aislar de bancos de anticuerpos de fagos utilizando técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención específicamente incluyen anticuerpos «quiméricos» (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpos particulares, mientras que el resto de la cadena(s) es o son idéntica(s) u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés de la presente memoria incluyen anticuerpos «primatizados» que

comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej. mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

5 Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (p. ej. murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) de mayormente secuencias humanas, que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable (también CDR) del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como
 10 ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de marco (FR, por su sigla en inglés) de Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Asimismo, los «anticuerpos humanizados» como se utilizan en la presente memoria también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar y optimizar aún más el rendimiento de los anticuerpos.
 15 De manera óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para mayor detalle, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)).

20 El término «anticuerpo humano» incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes correspondientes sustancialmente a secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las que describen Kabat et al. (Véase Kabat et al. (1991) loc. cit.). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana (p. ej. mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* aleatoria o específica de un sitio o por
 25 mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, y en particular, CDR3. El anticuerpo humano puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas por un residuo de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulinas de línea germinal humana.

30 Como se utiliza en la presente memoria, «anticuerpo generado *in vitro*» se refiere a un anticuerpo donde toda o parte de la región variable (p. ej. al menos una CDR) se genera en una selección de células no inmunes (p. ej. una expresión en fagos *in vitro*, chip de proteína o cualquier otro procedimiento mediante el cual se puede evaluar la capacidad de secuencias candidatas para unirse a un antígeno). Por ende, este término preferiblemente excluye secuencias generadas por reordenamiento genómico en una célula inmune.

35 En un aspecto preferido de la invención el tercer dominio que se une a la seroalbúmina se deriva de una CDR de un anticuerpo de dominio único. En un aspecto preferido de la invención, el tercer dominio que se une a la seroalbúmina no es de origen bacteriano tal como un dominio de unión a albúmina de proteína G de Streptococcus, tal como el dominio ABD3 de proteína G de la cepa de Streptococcus G418.

40 En un aspecto del anticuerpo biespecífico de la invención, el tercer dominio de unión comprende entre 10 y 25 residuos aa.

En un aspecto preferido de la invención el tercer dominio de unión que se une a seroalbúmina comprende la secuencia de aminoácidos Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp, donde Xaa es cualquier aminoácido.

- 5 Asimismo, en un aspecto del anticuerpo biespecífico de la invención, el tercer dominio de unión se une a seroalbúmina con una afinidad (KD) de ≤ 500 nM.

La vida media *in vivo* del fragmento Fab 4D5, etiquetado en el extremo C con diversos ABP que median distintas afinidades a albúmina se investigó en ratones, ratas y conejos (Nguyen et al., Prot Eng Des Sel 19(7), 291-297 (2006)). Según los valores de vida media determinados en estas distintas especies pequeñas en combinación con las afinidades ABP-Fab a albúmina murina, de rata y de conejo, se calculó que la vida media beta de un ABP-Fab con 500 mM de afinidad a albúmina humana fue 4 días en un ser humano de 70 kg de peso. Se anticipó que lo mismo sucede con un anticuerpo biespecífico etiquetado con ABP de la invención con una afinidad a albúmina humana de 500 mM, porque un anticuerpo biespecífico de la invención tal como un BiTE® (acoplador de linfocitos T biespecífico) tiene el mismo peso molecular que un fragmento Fab y, al igual que un fragmento Fab, está compuesto por un total de 4 dominios de inmunoglobulina.

Las mismas investigaciones confirmaron que mayor afinidad a albúmina (es decir, menor valor KD) da como resultado vida media *in vivo* más prolongada. En consecuencia, se espera que un anticuerpo biespecífico etiquetado con ABP de la invención con una afinidad a albúmina humana de 500 mM tenga una vida media de 4 días en seres humanos. Se espera que un anticuerpo biespecífico etiquetado con ABP de la invención con una afinidad a albúmina humana de 500 mM tenga una vida media de > 4 días en seres humanos. Asimismo, se espera que un anticuerpo biespecífico marcado con ABP de la invención con una afinidad a albúmina humana de >500 mM tenga una vida media de < 4 días en seres humanos.

25 Como se mencionó anteriormente, un anticuerpo biespecífico de la presente invención tiene preferiblemente una mayor vida media de suero.

Los procedimientos para análisis y determinación farmacocinéticos de vida media de ligandos les resultarán conocidos a los expertos en la técnica. Se pueden encontrar detalles en Kenneth, A et al. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a «Pharmacokinetics», M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª Rev. ex edition (1982), que describe parámetros farmacocinéticos tales como vidas medias t alfa y t beta y área bajo la curva (ABC).

35 La vida media se puede definir como el tiempo que tarda la concentración de suero del polipéptido en disminuir en un 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a degradación del anticuerpo biespecífico y/o aclaramiento o secuestro del anticuerpo biespecífico mediante mecanismos naturales. Los procedimientos para análisis y determinación farmacocinéticos de vida media les resultarán conocidos a los expertos en la técnica. Se pueden encontrar detalles en Kenneth, A et al. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters et al,

40

Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se puede hacer referencia a «Pharmacokinetics», M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición revisada (1982).

5 Se prefiere que un anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria tenga preferiblemente una vida media que sea al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la vida media del resto terapéutico correspondiente (es decir, un anticuerpo biespecífico que no comprende el tercer dominio como se describe en la presente memoria) en sí mismo.

10 Asimismo, preferiblemente, cualquiera de estos anticuerpos biespecíficos tiene una vida media que aumenta con más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, en comparación con la vida media del resto terapéutico correspondiente en sí mismo.

15 También preferiblemente, cualquiera de estos anticuerpos biespecíficos tiene una vida media que es más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, y por ejemplo de alrededor de un día, dos días, una semana, dos semanas o tres semanas, y preferiblemente no más de 2 meses, a pesar de que el último puede ser menos crítico, en comparación con la vida media del propio resto terapéutico correspondiente.

20 Asimismo, o de manera alternativa a los criterios mencionados anteriormente, la presente invención proporciona un ligando o una composición que comprende un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que tiene un valor ABC (área bajo la curva) en el intervalo de 1 mg. min/ml o mayor. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mg. min/ml. Además, o de manera alternativa, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención tiene un valor ABC en el intervalo de hasta 600 mg. min/ml. En una realización, el extremo superior del intervalo es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg. min/ml. De manera ventajosa, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención tendrá un valor ABC en el intervalo seleccionado de entre el grupo que comprende lo siguiente: 15 a 150 mg. min/ml, 15 a 100 mg. min/ml, 15 a 75 mg. min/ml, y 15 a 50 mg. min/ml.

30 En un aspecto adicional de la invención el anticuerpo biespecífico muestra actividad citotóxica en un ensayo *in vitro* que mide la lisis de células diana mediante células efectoras en presencia de seroalbúmina humana al 10 %.

35 La actividad citotóxica de un anticuerpo biespecífico de la invención se proporciona mediante el acoplamiento de un linfocito T citotóxico (mediante el dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T en la superficie de linfocitos T) y a un linfocito T (mediante la unión a una molécula de superficie celular en una célula diana). El ejemplo adjunto 2 proporciona una descripción de un ensayo *in vitro* apropiado para evaluar la actividad citotóxica del anticuerpo biespecífico de la invención en presencia de seroalbúmina humana al 10 %.

40 En un aspecto preferido de la presente invención el anticuerpo biespecífico está compuesto por una cadena de polipéptidos sencilla. Un ejemplo no restrictivo de uno de dichos anticuerpos biespecíficos monocatenarios es el formato del anticuerpo o inmunoglobulina bifuncional o biespecífico/a descrito más adelante en la presente memoria.

Un aspecto también preferido de la invención se refiere a una molécula de unión, donde

- (a) el primer dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpos; y/o
 (b) el segundo dominio de unión comprende una cadena VL y VH derivada de anticuerpos.

- 5 Preferiblemente, un anticuerpo o inmunoglobulina «biespecífico/a» o «bifuncional» es un anticuerpo o inmunoglobulina híbrido/a artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase, p. ej., Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990). Los expertos en la técnica disponen de numerosos procedimientos para obtener los anticuerpos
 10 o fragmentos de unión a antígeno de estos. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos utilizando procedimientos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). También se pueden producir anticuerpos monoclonales generando hibridomas (véase p. ej., Kohler & Milstein (1975) Nature, 256: 495-499) de acuerdo con procedimientos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera posteriormente se criban utilizando procedimientos corrientes, tales como ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y análisis de
 15 resonancia de plasmones superficiales (BIAcore™) para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno determinado. Cualquier forma del antígeno determinado se puede utilizar como el inmunógeno, p. ej., antígeno recombinante, formas que ocurren naturalmente, cualquier variante o fragmento de dicho antígeno, así como también un péptido antigénico de este.
- 20 Un procedimiento ejemplar para generar anticuerpos incluye el cribado de bancos de expresión de proteínas, p. ej., bancos de expresión en fagos o ribosomas. La expresión en fagos se describe, por ejemplo, en Ladner et al., patente de Estados Unidos N.º 5.223.409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628.
- 25 Además del uso de bancos de expresión, el antígeno determinado se puede utilizar para inmunizar un animal no humano, p. ej., un roedor, p. ej., un ratón, un conejillo de Indias o rata. En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Utilizando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos para antígenos
 30 derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, p. ej., XENOMOUSE™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21, US 2003- 0070185, publicaciones internacionales WO 96/34096, WO96/33735.

Un anticuerpo monoclonal que se puede obtener de un animal no humano, y luego modificarse, p. ej., volverse humanizado, desinmunizado, quimérico, se puede producir utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas en
 35 la técnica. Se han descrito varios enfoques para generar anticuerpos quiméricos. Véase p. ej., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; Boss et al., patente de Estados Unidos N.º 4.816.397; Tanaguchi et al., patente europea EP 0171496; patente europea EP 0173494, patente británica GB 2177096. Los anticuerpos humanizados también se pueden producir, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que expresan genes de cadena pesada y ligera humanos,
 40 pero son incapaces de expresar los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón endógena. Winter describe un procedimiento ejemplar de injerto de CDR que se puede utilizar para preparar los anticuerpos

humanizados descritos en la presente memoria (patente de Estados Unidos N.º 5.225.539). Todas las CDR de un anticuerpo humano particular se pueden reemplazar por al menos una porción de una CDR no humana, o solo algunas de las CDR se pueden reemplazar por CDR no humanas. Solo es necesario reemplazar la cantidad de CDR requeridas para unir el anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

5

Los anticuerpos humanizados o fragmentos de estos se pueden generar reemplazando secuencias del dominio variable Fv que no están directamente implicadas en unión a antígenos por secuencias equivalentes de dominios variables Fv humanos. Se proporcionan procedimientos ejemplares para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de estos en Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; en Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; y en las patentes de Estados Unidos US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; y US 6.407.213. Estos procedimientos incluyen aislar, manipular, y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todos o parte de los dominios variables Fv de inmunoglobulina de al menos una cadena pesada o ligera. Dichos ácidos nucleicos se pueden obtener de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se describe más arriba, así como de otras fuentes. A continuación, el ADN recombinante que codifica la molécula de anticuerpo humanizado se puede clonar en un vector de expresión apropiado.

15

Un anticuerpo humanizado se puede optimizar mediante la introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencias consenso, sustituciones de línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden generar mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica, (p. ej., Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., *Immunology Today*, 4: 7279, 1983; Olsson et al., *Meth. Enzymol.*, 92: 3-16, 1982), y se pueden generar de acuerdo con las enseñanzas de la patente europea EP 239 400.

20

Un anticuerpo o fragmento de este también se puede modificar mediante eliminación específica de epítomos de linfocito T humano o «desinmunización» mediante los procedimientos descritos en las publicaciones internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317. Brevemente, los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo se pueden analizar en cuanto a péptidos que se unen a CMH de clase II; estos péptidos representan epítomos de linfocito T potenciales (como se define en las publicaciones internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítomos de linfocito T potenciales, se puede aplicar un enfoque de simulación por ordenador denominado «reconocimiento del plegamiento de péptidos», y además se puede examinar una base de datos de péptidos de unión CMH de clase II humanos en busca de motivos presentes en las secuencias VH y VL, como se describe en las publicaciones internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 principales alotipos relacionados con el antígeno D de CMH de clase II, y, por ende, constituyen epítomos de linfocito T potenciales. Los epítomos de linfocito T potenciales detectados se pueden eliminar sustituyendo pequeñas cantidades de residuos de aminoácidos en los dominios variables, o preferiblemente, mediante sustituciones de aminoácidos únicos. Normalmente, se llevan a cabo sustituciones conservadoras. A menudo, pero no exclusivamente, se puede utilizar un aminoácido común a una posición en secuencias de anticuerpos de línea germinal humana. Las secuencias de línea germinal humana, p. ej., se describen en Tomlinson, et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G.P. et al. (1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14: 14:4628-4638. El directorio V-BASE proporciona un directorio exhaustivo de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (recopilado por Tomlinson, LA. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge,

35

40

Reino Unido). Estas secuencias se pueden utilizar como una fuente de secuencia humana, p. ej., para regiones marco y CDR. También se pueden utilizar regiones marco humanas consenso, p. ej., como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6.300.064.

5 El emparejamiento de una VH y VL juntas forma un sitio de unión a antígeno único. El dominio CH más próximo a VH se designa como CH1. Cada cadena L se enlaza con una cadena H mediante una unión disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí mediante una o más uniones disulfuro según el isotipo de la cadena H. Los dominios VH y VL están compuestos por regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones marco (FR1, FR2, FR3, y FR4), que forman matrices para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los
10 residuos responsables de interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. De acuerdo con lo anterior, los componentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2, y H3, mientras que los componentes en la cadena ligera se denominan L1, L2, y L3.

15 El término «variable» se refiere a las porciones de los dominios de inmunoglobulina que muestran variabilidad en su secuencia y que están implicados en determinar la especificidad y la afinidad de unión de un anticuerpo en particular (es decir, el «dominio o los dominios variable/variables»). La variabilidad no se distribuye de manera uniforme en todos los dominios variables de los anticuerpos; se concentra en subdominios de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Estos subdominios se denominan regiones «hipervariables» o «regiones determinantes de la complementariedad» (CDR). Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan regiones «marco» (FRM). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera que ocurren de manera natural comprenden regiones FRM, mayormente adoptando una configuración de lámina β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad
20 cercana mediante la FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno (véase Kabat et al., loc. cit.). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión a antígenos pero muestran diversas funciones efectoras, tales como, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, y activación de complemento.

30 También se prefiere para el anticuerpo biespecífico de la invención que el primer y segundo dominio formen una molécula que se selecciona de entre el grupo de (scFv)₂, (mAb de dominio único)₂, mAb de dominio único-scFv, diacuerpo u oligómeros de estos.

El término «CDR», haciendo referencia a singular o plural, se refiere a una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cual tres constituyen la naturaleza de unión de una región variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres constituyen la naturaleza de unión de una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones de matriz o de marco. Los límites y longitudes precisos que definen las CDR están sujetos a distintos sistemas de clasificación y numeración. En consecuencia, se
35 puede referir a las CDR mediante Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de límite, incluyendo el sistema de numeración descrito anteriormente. A pesar de los límites diferentes, cada uno de estos sistemas tiene

cierto grado de solapamiento en lo que constituye las denominadas «regiones hipervariables» dentro de las secuencias variables. En consecuencia, las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden diferir en longitud y áreas límite con respecto a la región marco adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat, Chothia, y/o MacCallum (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196: 901; y MacCallum et al., J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). No obstante, se prefiere la numeración de acuerdo con el denominado sistema Kabat.

El término «aminoácido» o «residuo de aminoácido» normalmente se refiere a un aminoácido que tiene su definición reconocida en la técnica tal como un aminoácido seleccionado de entre el grupo compuesto por: alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (He o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); pro lina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V), si bien se prefieren aminoácidos modificados, sintéticos o raros. En general, los aminoácidos se pueden agrupar según tengan una cadena lateral no polar (p. ej., Ala, Cys, He, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral con carga negativa (p. ej., Asp, Glu); una cadena lateral con carga positiva (p. ej., Arg, His, Lys); o una cadena lateral polar sin carga (p. ej., Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, y Tyr).

El término «región hipervariable» (también conocida como «regiones determinantes de la complementariedad» o CDR) cuando se lo emplea en la presente memoria se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son (normalmente tres o regiones cortas de variabilidad de secuencia extrema) dentro del dominio de región V de una inmunoglobulina que forman el sitio de unión a antígeno y son los principales determinantes de especificidad de antígeno. Existen por lo menos dos procedimientos para identificar los residuos de CDR: (1) Un enfoque basado en variabilidad de secuencia de una especie a otra (es decir, Kabat et al., loc. cit.); y (2) Un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Sin embargo, en la medida que dos técnicas de identificación de residuos definan regiones de solapamiento, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. No obstante, en general, los residuos de CDR preferiblemente se identifican de acuerdo con el llamado sistema (de numeración) Kabat.

El término «región marco» se refiere a las porciones reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existe entre las dos CDR más divergentes (es decir, hipervariables). A dichas regiones marco normalmente se las denomina como marcos 1 a 4 (FR1, FR2, FR3, y FR4) y proporcionan una matriz para la presentación de las seis CDR (tres de la cadena pesada y tres de la cadena ligera) en tres espacios dimensionales, para formar una superficie de unión a antígeno.

Normalmente, las CDR forman una estructura de bucle que se puede clasificar como una estructura canónica. El término «estructura canónica» se refiere a la principal conformación de cadena que se adopta mediante los bucles de unión a antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha descubierto que cinco de los seis bucles de unión a antígeno tienen únicamente un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica puede estar caracterizada por los ángulos de torsión de la cadena principal de polipéptidos. En consecuencia, los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la elevada variabilidad de secuencias de aminoácidos en la mayor parte de los bucles (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia et al., Nature, 1989, 342: 877; Martin & Thornton, J. Mol. Biol, 1996,

263: 800). Asimismo, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una clase canónica particular se determina mediante la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en posiciones clave dentro del bucle, así como dentro del marco conservado (es decir, fuera del bucle). Por lo tanto, la asignación a una clase canónica particular se puede llevar a cabo según la presencia de estos residuos de aminoácidos clave. El término «estructura canónica» también puede incluir consideraciones en cuanto a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, como la clasifica Kabat (Kabat et al., loc. cit.). El esquema (sistema) de numeración de Kabat es una norma ampliamente adoptada para numerar los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo de manera coherente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como se menciona en otras partes de la presente memoria. También se pueden utilizar consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, estas diferencias no completamente reflejadas por la numeración Kabat se pueden describir mediante el sistema de numeración de Chothia et al y/o se pueden revelar a través de otras técnicas, por ejemplo, cristalografía y simulación por ordenador bidimensional o tridimensional. De acuerdo con lo anterior, una secuencia de anticuerpo determinada se puede ubicar en una clase canónica que permite, entre otras cosas, identificar secuencias de armazón apropiadas (p. ej., basadas en un deseo de incluir una variedad de estructuras canónicas en un banco). La numeración Kabat de secuencias de aminoácidos y consideraciones estructurales como se describen en Chothia et al., loc. Cit. y sus implicaciones para interpretar aspectos canónicos de estructura de anticuerpos se describen en la bibliografía.

Normalmente, CDR3 es la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión a anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o mayor que 26 aminoácidos. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de distintas clases de inmunoglobulinas son muy conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura de los anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988. Un experto en la técnica reconocerá que cada estructura de subunidad, p. ej., una estructura CH, VH, CL, VL, CDR, FR, comprende fragmentos activos, p. ej., la porción de la subunidad VH, VL, o CDR que se une al antígeno, es decir, el fragmento de unión a antígeno, o, p. ej., la porción de la subunidad CH que se une a y/o activa, p. ej., un receptor Fc y/o complemento. Normalmente las CDR se refieren a las CDR de Kabat, como se describe en *Sequences of Proteins of immunological Interest*, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al. Otra norma para caracterizar el sitio de unión a antígeno es referirse a los bucles hipervariables como describe Chothia. Véase, p. ej., Chothia, et al. (1987; *J. Mol. Biol.* 227:799-817); y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4628-4638. Incluso otra norma es la definición de AbM utilizada por el software de simulación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, en general, p. ej., *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. En: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Las realizaciones descritas con respecto a las CDR de Kabat pueden implementarse de manera alternativa utilizando relaciones similares descritas respecto de bucles hipervariables de Chothia o de los bucles definidos por AbM.

La secuencia de genes de anticuerpo después de su armado y mutación somática es altamente variada, y se estima que estos genes variados codifican 1.010 moléculas de anticuerpo diferentes (*Immunoglobulin Genes*, 2ª ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Por consiguiente, el sistema inmune proporciona un repertorio de inmunoglobulinas. El término «repertorio» se refiere a al menos una secuencia de nucleótidos derivada completa

o parcialmente de al menos una secuencia que codifica al menos una inmunoglobulina. La secuencia o secuencias se pueden generar mediante reordenamiento *in vivo* de los segmentos V, D y J de cadenas pesadas, y los segmentos V y J de cadenas ligeras. Como alternativa, la secuencia o secuencias se pueden generar a partir de una célula en respuesta a la cual se produce el reordenamiento, p. ej., estimulación *in vitro*. Como alternativa, parte o
 5 todas las secuencia o secuencias se pueden obtener mediante empalme de ADN, síntesis de nucleótidos, mutagénesis, y otros procedimientos, véase, p. ej., patente de Estados Unidos N.º 5.565.332. Un repertorio puede incluir únicamente una secuencia o puede incluir múltiples secuencias, incluyendo unas en una colección genéticamente diversa.

10 En un aspecto preferido adicional de la invención, las cadenas VL y VH del primer y/o segundo dominio de unión son humanizadas, desimmunizadas y/o de otra forma optimizadas con respecto a su inmunogenicidad o afinidad de unión.

En un aspecto del anticuerpo biespecífico de la invención el anticuerpo biespecífico comprende uno o más
 15 polipéptidos heterólogos adicionales. «Heterólogo» cuando se utiliza en este contexto significa que la secuencia de aminoácidos de la secuencia de polipéptidos heterólogos es distinta de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo biespecífico de la presente invención que comprende dicho polipéptido heterólogo adicional. El polipéptido heterólogo preferiblemente se selecciona de entre el grupo compuesto por una etiqueta HA, etiqueta myc6, etiqueta flag, etiqueta strep, etiqueta strepII, etiqueta TAP, etiqueta HAT, dominio de unión a quitina (CBD), proteína de unión
 20 a maltosa, inmunoglobulina A (IgA), etiqueta His-6, etiqueta glutatión S transferasa (GST), inteína, etiqueta de proteína de unión a estreptavidina (SBP), etiqueta Strep y etiqueta StrepII. Aunque se prefiere menos, también se prevé que dicho polipéptido heterólogo podría ser una región Fc de un anticuerpo.

De acuerdo con la definición anterior el péptido heterólogo puede ser un dominio útil para aislar un anticuerpo
 25 biespecífico y se puede elegir a partir de motivos de péptidos o restos introducidos de manera secundaria, que se pueden capturar en un procedimiento de aislamiento, p. ej. una columna de aislamiento. Las realizaciones no restrictivas de dichos dominios adicionales comprenden motivos de péptidos conocidos como etiqueta Myc, etiqueta HAT, etiqueta HA, etiqueta TAP, etiqueta GST, dominio de unión a quitina (etiqueta CBD), proteína de unión a maltosa (etiqueta MBP), etiqueta Flag, etiqueta Strep y variantes de estos (p. ej. etiqueta StrepII) y etiqueta His. Se
 30 prefiere que todos los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente memoria comprendan un dominio de etiqueta His, que generalmente se conoce como una repetición de residuos His consecutivos en la secuencia de aminoácidos de una molécula, preferiblemente de seis residuos His.

Asimismo, en un aspecto de la invención el primer dominio de unión del anticuerpo biespecífico que se une a una
 35 molécula de superficie celular se une a un antígeno tumoral.

El término «antígeno tumoral» como se usa en la presente memoria se ha de entender como aquellos antígenos que se presentan en células tumorales. Estos antígenos se pueden presentar en la superficie celular con una parte extracelular, que a menudo se combina con una transmembrana y parte citoplasmática de la molécula. Estos
 40 antígenos a veces se pueden presentar únicamente mediante células tumorales y nunca mediante células normales. Los antígenos tumorales se pueden expresar exclusivamente en células tumorales o podrían representar una

mutación específica de tumor en comparación con células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumor. Son más comunes los antígenos que se presentan mediante células tumorales y células normales, y se denominan antígenos asociados a tumores. Estos antígenos asociados a tumores pueden estar sobreexpresados en comparación con células normales o son accesibles para unión a anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido tumoral en comparación con tejido normal.

Asimismo, en un aspecto del anticuerpo biespecífico de la invención el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T se puede unir a un epítipo de cadena CD3ε humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo compuesto por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, u 8 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu.

En otro aspecto de la invención, el segundo dominio de unión se puede unir a CD3 épsilon. Incluso en otro aspecto de la invención, el segundo dominio de unión se puede unir a CD3 humana y a CD3 de macaco, preferiblemente a CD3 épsilon humana y a CD3 épsilon de macaco. De manera adicional o alternativa, el segundo dominio de unión se puede unir a CD3 épsilon de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* y/o *Saimiri sciureus*. De acuerdo con estas realizaciones, uno o ambos dominios de unión del anticuerpo biespecífico de la invención son preferiblemente específicos de una especie a otra para miembros del orden de mamíferos de los primates. Los dominios de unión a CD3 específicos de una especie a otra se describen, por ejemplo, en la publicación internacional WO 2008/119567.

En particular es preferible para el anticuerpo biespecífico de la presente invención que el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T comprenda una región VL que incluya CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionados de entre:

- (a) CDR-L1 como se representa en la SEQ ID NO: 27 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en la SEQ ID NO: 28 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-L3 como se representa en la SEQ ID NO: 29 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (b) CDR-L1 como se representa en la SEQ ID NO: 117 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en la SEQ ID NO: 118 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-L3 como se representa en la SEQ ID NO: 119 de la publicación internacional WO 2008/119567; y
- (c) CDR-L1 como se representa en la SEQ ID NO: 153 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-L2 como se representa en la SEQ ID NO: 154 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-L3 como se representa en la SEQ ID NO: 155 de la publicación internacional WO 2008/119567.

En una realización alternativamente preferida del anticuerpo biespecífico de la presente invención, el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T comprende una región VH que incluye CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionados de entre:

- (a) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 12 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 13 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 14 de la publicación internacional WO 2008/119567;

- (b) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 30 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 31 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 32 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (c) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 48 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 49 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 50 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (d) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 66 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 67 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 68 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (e) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 84 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 85 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 86 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (f) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 102 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 103 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 104 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (g) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 120 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 121 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 122 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (h) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 138 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 139 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 140 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (h) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 156 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 157 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 158 de la publicación internacional WO 2008/119567; y
- (j) CDR-H1 como se representa en la SEQ ID NO: 174 de la publicación internacional WO 2008/119567, CDR-H2 como se representa en la SEQ ID NO: 175 de la publicación internacional WO 2008/119567, y CDR-H3 como se representa en la SEQ ID NO: 176 de la publicación internacional WO 2008/119567.

Asimismo, es preferible para el anticuerpo biespecífico de la presente invención que el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T comprenda una región VL seleccionada de entre el grupo compuesto por una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 35, 39, 125, 129, 161 o 165 de la publicación internacional WO 2008/119567.

Se prefiere de manera alternativa que el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T comprenda una región VH seleccionada de entre el grupo compuesto por una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 o 181 de la publicación internacional WO 2008/119567.

Más preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de la presente invención se caracteriza porque el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T comprende una región VL y una región VH seleccionadas de entre el grupo compuesto por:

- (a) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 17 o 21 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 15 o 19 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- 5 (b) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 35 o 39 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 33 o 37 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (c) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 53 o 57 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 51 o 55 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (d) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 71 o 75 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 69 o 73 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- 10 (e) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 89 o 93 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 87 o 91 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (f) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 107 o 111 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 105 o 109 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- 15 (g) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 125 o 129 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 123 o 127 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- (h) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 143 o 147 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 141 o 145 de la publicación internacional WO 2008/119567;
- 20 (i) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 161 o 165 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 159 o 163 de la publicación internacional WO 2008/119567; y
- (j) una región VL como se representa en las SEQ ID NO: 179 o 183 de la publicación internacional WO 2008/119567, y una región VH como se representa en las SEQ ID NO: 177 o 181 de la publicación internacional WO 2008/119567.

De acuerdo con una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la presente invención, en particular el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T, los pares de regiones VH y VL 30 tienen formato de un anticuerpo monocatenario (scFv). Las regiones VH y VL se disponen en el orden VH-VL o VL-VH. Se prefiere que la región VH se posicione en el extremo N-terminal en una secuencia de enlazadores. La región VL se posiciona en el extremo N-terminal de la secuencia de enlazadores.

Una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la presente invención descrito anteriormente se caracteriza 35 porque el segundo dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo compuesto por las SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 o 187 de la publicación internacional WO 2008/119567.

En una realización el anticuerpo biespecífico de la invención se caracteriza por una secuencia de aminoácidos como 40 se representa en las SEQ ID NO: 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 75, 76, 81, 82, 85, 86, 90, 91, 85, 96, 100 o 101.

El anticuerpo biespecífico de la presente invención es preferiblemente una molécula de unión «aislada». «Aislada» cuando se emplea para describir el anticuerpo biespecífico descrito en la presente memoria significa un anticuerpo biespecífico que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tal como el que resulta de células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo biespecífico se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción argéntica. No obstante, generalmente un anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Se contemplan modificaciones a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos se preparan introduciendo cambios de nucleótido apropiados en el ácido nucleico de anticuerpos biespecíficos y mediante síntesis peptídica.

Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se lleva a cabo para conseguir el constructo final, siempre que el constructo final tenga las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales de los anticuerpos biespecíficos, tal como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación. Preferiblemente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos pueden sustituirse en una CDR, mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 25 aminoácidos pueden sustituirse en las regiones de marco (FR). Las sustituciones son preferiblemente sustituciones conservadoras, como se describen en la presente memoria. De manera adicional o alternativa, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 aminoácidos pueden insertarse o eliminarse en cada una de las CDR, (obviamente dependiendo de su longitud), mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 25 aminoácidos pueden insertarse o eliminarse en cada una de las FR.

Un procedimiento útil para identificar ciertos residuos o regiones de los anticuerpos biespecíficos que son ubicaciones preferidas para mutagénesis se denomina «mutagénesis dirigida por barrido de alanina» como describen Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). En la presente memoria, un residuo o grupo de residuos diana dentro del anticuerpo biespecífico se identifican (p. ej. residuos con carga tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el epítipo.

Entonces, las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales o distintas en o para los sitios de sustitución. Por lo tanto, si bien el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácido está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí misma

no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio determinado, se lleva a cabo mutagénesis aleatoria o dirigida por barrido de alanina en un codón o región diana y las variantes de anticuerpo biespecífico expresadas se criban para determinar la actividad deseada.

5 Preferiblemente, las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- o carboxilo-terminal que oscilan en longitud entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Una variante de inserción del anticuerpo biespecífico incluye la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o una fusión a un polipéptido que aumenta la vida media del suero del anticuerpo.

10 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen preferiblemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos en el anticuerpo biespecífico reemplazados por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las CDR de la cadena pesada y/o ligera, en particular las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de las FR en la cadena pesada y/o ligera.

15 Por ejemplo, si una secuencia de CDR engloba 6 aminoácidos, se prevé que uno, dos o tres de estos aminoácidos sean sustituidos. De manera similar, si una secuencia de CDR engloba 15 aminoácidos se prevé que uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de estos aminoácidos sean sustituidos.

20 Como regla general, si los aminoácidos se sustituyen en una o más o todas las CDR de la cadena pesada y/o ligera, se prefiere que la secuencia «sustituida» así obtenida sea al menos 60 %, más preferiblemente 65 %, incluso más preferiblemente 70 %, en particular preferiblemente 75 %, más en particular preferiblemente 80 % idéntica a la secuencia de CDR «original». Esto significa que el grado de identidad respecto de la secuencia «sustituida» depende de la longitud de la CDR. Por ejemplo, una CDR que tiene 5 aminoácidos es preferiblemente 80 % idéntica a su secuencia sustituida para tener al menos un aminoácido sustituido. En consecuencia, las CDR del anticuerpo biespecífico pueden tener distintos grados de identidad respecto de sus secuencias sustituidas, p. ej. la CDRL1 puede tener 80 %, mientras que la CDRL3 puede tener 90 %.

30 Las sustituciones preferidas (o reemplazos) son sustituciones conservadoras. No obstante, se prevé cualquier sustitución (incluyendo sustitución no conservadora o una o más de las «sustituciones ejemplares» incluidas en la Tabla 2 que se muestra más adelante) siempre que el anticuerpo biespecífico retenga su capacidad para unirse a la molécula superficial en una célula diana mediante el primer dominio de unión y al complejo receptor CD3 en un linfocito T mediante el segundo dominio de unión y/o sus CDR tengan identidad respecto de la secuencia así sustituida (al menos 60 %, más preferiblemente 65 %, incluso más preferiblemente 70 %, en particular preferiblemente 75 %, más en particular preferiblemente 80 % idénticas respecto de la secuencia de CDR «original»).

40 Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 2 debajo del encabezado «sustituciones preferidas». Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en actividad biológica, se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados «sustituciones ejemplares» en la Tabla 2, o como se describe adicionalmente a

continuación en relación con clases de aminoácidos, y los productos se pueden cribar para determinar una característica deseada.

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos

5

Original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	norleucina, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo biespecífico de la presente invención se consiguen seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal de polipéptidos en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos según propiedades de cadena lateral comunes. (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr; (3) ácidos: asp, glu; (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

15 Las sustituciones no conservadoras implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo biespecífico se puede sustituir, en general, por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, el o los enlaces de cisteína se pueden añadir al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

20

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo precursor (p. ej. un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollarse posteriormente tendrán propiedades biológicas mejoradas respecto del anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una forma conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica maduración de afinidad mediante expresión en fagos. Brevemente, distintos sitios de región hipervariable (p. ej. 6-7 sitios) se hacen mutar para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se muestran de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto de gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en fagos se criban para determinar su actividad biológica (p. ej. afinidad de unión) como se describe en la presente memoria. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se puede llevar a cabo mutagénesis dirigida por barrido de alanina para identificar los residuos de región hipervariable que contribuyen de manera significativa a la unión a antígeno. Como alternativa, o de manera adicional, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el dominio de unión y, p. ej. la molécula superficial en una célula diana y el complejo receptor CD3 en un linfocito T. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos de sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en la presente memoria y es posible seleccionar para desarrollo posterior anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes.

En la presente memoria se contemplan otras modificaciones del anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico se puede enlazar con uno de una variedad de polímeros no proteicos, p. ej. polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo biespecífico también puede estar contenido en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmecacilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente memoria también se pueden formular como inmuno-liposomas. Un «liposoma» es una vesícula pequeña compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos útiles para administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se ordenan comúnmente en una formación bicapa, similar al ordenamiento de lípidos de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); patentes de Estados Unidos N.º 4.485.045 y 4.544.545; y publicación internacional WO 97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de Estados Unidos N.º 5.013.556. Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden mediante filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-

288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico puede estar opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

5 Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo biespecífico se puede producir entre células, en el espacio periplásmico, o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo biespecífico se produce entre células, como primera etapa, el resto de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se elimina, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de E. coli.

10 La composición de anticuerpo biespecífico preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico de la invención. En el caso de que el anticuerpo biespecífico de la invención sea un heterodímero o heteromultímero también se prevé que el anticuerpo biespecífico se pueda codificar mediante más de una secuencia/molécula de ácido nucleico, p. ej. una secuencia/molécula de ácido nucleico para cada cadena de polipéptidos simple.

20 El término «ácido nucleico» es muy conocido para el experto en la técnica y engloba ADN (tal como ADNc) y ARN (tal como ARNm). El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario. Dicha molécula de ácido nucleico está preferiblemente comprendida en un vector que está preferiblemente comprendido en una célula huésped. Dicha célula huésped está, p. ej. después de transformación o transfección con la secuencia de ácido nucleico de la invención, expresando la molécula de unión. Con dicho propósito la molécula de ácido nucleico se enlaza de manera
25 operativa con secuencias de control.

Un aspecto alternativo de la invención es un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define anteriormente en la presente memoria. Un vector es una molécula de ácido nucleico utilizada como un vehículo para transferir material genético (extraño) a la célula. El término «vector» engloba, sin carácter restrictivo, plásmidos,
30 virus, cósmidos y cromosomas artificiales. En general, los vectores manipulados comprenden un origen de replicación, un sitio de multiclonación y un marcador seleccionable. El vector en sí mismo es, por lo general, una secuencia de nucleótidos, normalmente una secuencia de ADN, que comprende un inserto (transgén) y una secuencia mayor que sirve como la «cadena principal» del vector. Los vectores modernos pueden englobar rasgos adicionales además del inserto de transgén y una cadena principal: promotor, marcador genético, resistencia a
35 antibióticos, gen reportero, secuencia diana, etiqueta de purificación de proteína. Los vectores denominados vectores de expresión (constructos de expresión) específicamente son para la expresión del transgén en la célula diana, y generalmente tienen secuencias de control tal como una secuencia promotora que conduce la expresión del transgén. La inserción de un vector en la célula diana comúnmente se denomina «transformación» para células bacterianas, «transfección» para células eucariotas, si bien la inserción de un vector viral también se denomina
40 «transducción».

Asimismo, un aspecto alternativo de la invención es una célula huésped transformada o transfectada con la secuencia de ácido nucleico como se define anteriormente en la presente memoria. Tal y como se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término «célula huésped» haga referencia a una célula en la cual se introduce un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico de la invención mediante transformación, transfección y procesos similares. Se ha de entender que tales términos se refieren no sólo a la célula objeto particular, sino a la progenie o potencial progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula precursora, pero aun así estar incluida dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

5

10

Como se utiliza en la presente memoria, el término «expresión» incluye cualquier etapa involucrada en la producción de un anticuerpo biespecífico de la invención que incluye, sin carácter restrictivo, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

15

El término «secuencias de control» se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación enlazada de manera operativa en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son apropiadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

20

Un ácido nucleico está «enlazado de manera operativa» cuando se establece una relación funcional entre él y otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un ADN para una presecuencia o líder de secreción está enlazado de manera operativa con un ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de manera operativa con una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de manera operativa a una secuencia de codificación si está posicionado como para facilitar la traducción. Como regla general, «enlazado de manera operativa» significa que las secuencias de ADN que se están enlazando son contiguas, y, en el caso de un líder de secreción, son contiguas y están en fase de lectura. No obstante, los potenciadores no necesitan ser contiguos. El enlace se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

25

30

Los términos «célula huésped», «célula diana» o «célula receptora» pretenden incluir cualquier célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido receptor de vectores o la incorporación de moléculas de ácidos nucleicos exógenos, polinucleótidos y/o proteínas. También pretenden incluir progenie de una célula única, y la progenie puede no ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico o total) a la célula precursora original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Las células pueden ser procariotas o eucariotas, e incluir, sin carácter restrictivo, células bacterianas, células de levadura, células de hongos, células de animales, y células de mamíferos, p. ej. murinas, de rata, de macaco o humanas.

35

40

Entre las células huésped apropiadas se incluyen células huésped procariotas y eucariotas que incluyen levaduras, hongos, células de insectos y células de mamíferos.

El anticuerpo biespecífico de la invención se puede producir en bacterias. Después de la expresión, el anticuerpo biespecífico de la invención, preferiblemente el anticuerpo biespecífico se aísla de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, p. ej. cromatografía de afinidad y/o exclusión por tamaño. La purificación final se puede llevar a cabo de manera similar al proceso para purificar anticuerpos expresados p. ej. en células CHO.

Además de procariontes, los microbios eucariotas tales como levadura u hongos filamentosos son huéspedes de clonación o expresión apropiados para el anticuerpo biespecífico de la invención. La *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es la más utilizada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, en la presente memoria están disponibles y resultan útiles varios otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*, huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, p. ej., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (patente europea EP 402 226); *Pichia pastoris* (patente europea EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (patente europea EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, p. ej., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped apropiadas para la expresión del anticuerpo biespecífico glicosilado de la invención, preferiblemente anticuerpos biespecíficos derivados de anticuerpo se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y células huésped de insectos permisivas correspondientes a partir de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas de virus para transfección está disponible públicamente, p. ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus de la presente memoria de acuerdo con la invención, en particular para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar como huéspedes los cultivos celulares de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, *Arabidopsis* y tabaco. Los vectores de clonación y expresión útiles para la producción de proteínas en cultivo celular de plantas son conocidos para los expertos en la técnica. Véase, p. ej. Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, y Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Sin embargo, ha existido mayor interés en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se encuentran la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36 : 59 (1977)); células de riñón de conejillo de Indias recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de conejillo de Indias chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CVI

ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de cáncer de cuello uterino humanas (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, 1413 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo biespecífico de la invención se puede producir entre células, en el espacio periplásmico, o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo biespecífico se produce entre células, como primera etapa, el resto de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se elimina, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. El resto celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, en primer lugar, por lo general, se concentran sobrenadantes de dichos sistemas de expresión mediante un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasas tal como PSMF en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el desarrollo de contaminantes adventicios.

El anticuerpo biespecífico de la invención preparado a partir de las células huésped se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida.

La matriz a la que se sujeta el ligando de afinidad es, por lo general, agarosa, pero también existen otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli (estireno divinil) benceno permiten velocidades de flujo superiores y tiempos de procesamiento más breves de los que se pueden alcanzar con agarosa. Cuando el anticuerpo biespecífico de la invención comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXmresin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) resulta útil para la purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tal como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles según el anticuerpo que se ha de recuperar.

En otro aspecto, se proporcionan procesos para la producción de anticuerpos biespecíficos de la invención, comprendiendo dichos procesos cultivar una célula huésped definida en la presente memoria en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo biespecífico de la invención y recuperar el anticuerpo biespecífico a partir del cultivo.

El término «cultivar» se refiere al mantenimiento, diferenciación, crecimiento, proliferación y/o propagación *in vitro* de células en condiciones apropiadas en un medio.

En una realización alternativa, se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo biespecífico de la invención, o producido de acuerdo con el proceso de la invención. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término «composición farmacéutica» se refiere a una composición para administrar a un paciente, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica particular preferida de esta invención comprende el anticuerpo biespecífico de la invención. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende formulaciones apropiadas de vehículos, estabilizantes y/o excipientes. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una composición para administración parenteral, transdérmica, intraluminal, 10 intraarterial, intratecal y/o intranasal y para inyección directa en tejido. En particular se prevé que dicha composición se administre a un paciente vía infusión o inyección. La administración de las composiciones apropiadas se puede llevar a cabo mediante distintas formas, p. ej., mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En particular, la presente invención proporciona una administración ininterrumpida de la composición apropiada. Como ejemplo no restrictivo, la administración ininterrumpida, es decir, 15 continua, se puede llevar a cabo mediante un pequeño sistema de bombeo que lleva puesto el paciente para medir el flujo de entrada de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de la invención se puede administrar utilizando dichos sistemas de bombeo. Dichos sistemas de bombeo son generalmente conocidos en la técnica, y normalmente dependen del recambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se ha de infundir. Cuando se cambia el cartucho en dicho 20 sistema de bombeo, se puede producir una interrupción temporal del flujo de otro modo ininterrumpido de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. En este caso, la fase de administración previa al recambio de cartucho y la fase de administración que sigue al recambio del cartucho todavía se considerarían dentro del significado de los medios farmacéuticos y los procedimientos farmacéuticos de la invención juntos constituyen una «administración ininterrumpida» de dicho agente terapéutico.

25 La administración continua o ininterrumpida de estos anticuerpos biespecíficos de la invención puede ser intravenosa o subcutánea mediante un dispositivo de administración de fluido o sistema de bombeo pequeño que incluye un mecanismo de dirección de fluido para dirigir el fluido fuera de un depósito y un mecanismo de accionamiento para accionar el mecanismo de dirección. Los sistemas de bombeo para administración subcutánea 30 pueden incluir una aguja o una cánula para penetrar la piel de un paciente y administrar la composición apropiada en el cuerpo del paciente. Dichos sistemas de bombeo pueden estar directamente fijados o sujetos a la piel del paciente independientemente de una vena, arteria o vaso sanguíneo, permitiendo de este modo un contacto directo entre el sistema de bombeo y la piel del paciente. El sistema de bombeo se puede sujetar a la piel del paciente durante 24 horas hasta varios días. El sistema de bombeo puede ser de tamaño reducido con un depósito para volúmenes 35 pequeños. Como ejemplo no restrictivo, el volumen del depósito para la composición farmacéutica apropiada que se ha de administrar puede estar entre 0,1 y 50 ml.

La administración continua puede ser transdérmica y aplicarse mediante un parche que se coloca en la piel y que se reemplaza al cabo de intervalos de tiempo. Un experto en la técnica conoce sistemas de parche para administración 40 de fármacos apropiados para este propósito. Cabe observar que la administración transdérmica es especialmente susceptible de administración ininterrumpida, puesto que el recambio de un primer parche gastado puede

conseguirse ventajosamente a la vez que se coloca un nuevo, segundo, parche, por ejemplo, en la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parte gastado e inmediatamente antes de retirar el primer parche gastado. No se suscitan problemas de interrupción de flujo o de fallo de potencia de células.

5 Las composiciones de la invención pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos apropiados son muy conocidos en la técnica e incluyen disoluciones, p. ej. disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de agua/aceite, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, liposomas, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales conocidos. Las formulaciones pueden
10 comprender carbohidratos, disoluciones tampón, aminoácidos y/o tensioactivos. Los carbohidratos pueden ser azúcares no reductores, preferiblemente trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol. En general, como se usa en la presente memoria, «vehículo farmacéuticamente aceptable» significa cualquiera o todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, compatibles con administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias
15 farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleados e incluyen: agentes tamponantes adicionales; conservantes; co-disolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metales (p. ej., complejos de proteína de Zn); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sal, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihídricos, aminoácidos, tales
20 como alanina, glicina, asparagina, 2-fenilalanina, y treonina; azúcares o alcoholes de azúcar, tales como trehalosa, sacarosa, octasulfato, sorbitol o xilitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, mioinositosa, galactosa, lactitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol, ciclitoles (p. ej., inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol, y tiosulfato sódico; proteínas de bajo peso molecular, tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina, u otras
25 inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona. Dichas formulaciones se pueden utilizar para administraciones continuas que pueden ser intravenosas o subcutáneas con y/o sin sistemas de bombeo. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos con carga, preferiblemente lisina, acetato de lisina, arginina, glutamato y/o histidina. Los tensioactivos pueden ser detergentes, preferiblemente con un peso molecular de >1,2 KD y/o un poliéter, preferiblemente con un peso molecular de >3 KD. Los ejemplos no restrictivos para detergentes preferidos
30 son Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 o Tween 85. Los ejemplos no restrictivos para poliéteres preferidos son PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 o PEG 5000. Los sistemas tampón utilizados en la presente invención pueden tener un pH preferido de 5-9 y pueden comprender citrato, succinato, fosfato, histidina y acetato.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto con una dosis apropiada que se puede
35 determinar, p. ej., mediante estudios con escalonado de dosis con administración de dosis en aumento del polipéptido de la invención que muestra especificidad de una especie a otra descrito en la presente memoria a primates no chimpancés, por ejemplo, macacos. Como se indicó anteriormente, el anticuerpo biespecífico de la invención que muestra especificidad de una especie a otra descrito en la presente memoria puede utilizarse de manera ventajosa de forma idéntica en ensayos preclínicos en primates no chimpancés y como fármaco en
40 humanos. Estas composiciones también se pueden administrar en combinación con otros fármacos proteicos y no proteicos. Estos fármacos se pueden administrar de manera simultánea con la composición que comprende el

polipéptido de la invención como se define en la presente memoria, o por separado antes o después de la administración de dicho polipéptido en intervalos y dosis definidos de manera oportuna. El régimen de dosis será determinado por el médico responsable del tratamiento y por los factores clínicos. Como se conoce en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se ha de administrar, el género, las horas y vía de administración, el estado de salud general, y otros fármacos que se estén administrando a la vez.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Entre los ejemplos de disolventes no acuosos se encuentran propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones acuosas/alcohólicas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de dextrosa y de sodio, solución láctica de Ringer, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Además, la composición de la presente invención podría comprender vehículos proteicos como, p. ej., seroalbúmina o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición de la invención podría comprender, además del polipéptido de la invención definido en la presente memoria, agentes adicionales biológicamente activos, según el uso buscado para la composición. Dichos agentes podrían ser fármacos que actúan en el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben las inmunoreacciones (p. ej. corticosteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan en el sistema circulatorio y/o agentes tales como citoquinas conocidas en la técnica. También se prevé que el anticuerpo biespecífico de la presente invención se aplique en una coterapia, es decir, en combinación con otro medicamento contra el cáncer.

La actividad biológica de la composición farmacéutica definida en la presente memoria se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad, como se describe en los siguientes ejemplos, en la publicación internacional WO 99/54440 o según describen Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). «Eficacia» o «eficacia *in vivo*» como se emplean en la presente memoria se refieren a la respuesta a la terapia por la composición farmacéutica de la invención, utilizando, p. ej. criterios de respuesta del NCI estandarizados. El éxito o eficacia *in vivo* de la terapia que emplea una composición farmacéutica de la invención se refiere a la eficacia de la composición para el fin buscado, es decir, la capacidad de la composición para producir su efecto deseado, es decir, disminución de células patológicas, p. ej. células tumorales. La eficacia *in vivo* se puede monitorizar mediante procedimientos estándar establecidos para las respectivas entidades de enfermedad incluyendo, sin carácter restrictivo, recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación celular activada por fluorescencia, aspiración de médula ósea. Asimismo, se pueden utilizar diversos parámetros de química clínica específicos de enfermedades y otros procedimientos estándar establecidos. Por otra parte, se pueden emplear tomografía asistida por ordenador, rayos X, tomografía por resonancia magnética nuclear (p. ej. para evaluación de respuestas basadas en criterios del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris

NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1244], exploración por tomografía por emisión de positrones, recuentos de glóbulos blancos, diferenciales, clasificación celular activada por fluorescencia, aspiración de médula ósea, biopsias/histologías de nódulo linfático, y diversos parámetros de química clínica específicos de linfoma (p. ej. lactato deshidrogenasa) y otros procedimientos estándar establecidos.

Otro reto importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica de la invención es la modulación predecible de propiedades farmacocinéticas. Con este propósito, se puede establecer un perfil farmacocinético del fármaco candidato, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan la capacidad de un fármaco concreto para tratar una afección determinada. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen la capacidad de un fármaco para tratar determinada enfermedad incluyen, sin carácter restrictivo: vida media, volumen de distribución, metabolismo de primer paso hepático y el grado de unión a suero sanguíneo. La eficacia de un agente de fármaco determinado puede estar influenciada por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente.

«Vida media» cuando se utiliza en la presente memoria en el contexto de un fármaco significa el tiempo en el cual 50 % de un fármaco administrado se elimina mediante procesos biológicos, p. ej. metabolismo, excreción, etc.

«Metabolismo de primer paso hepático» significa la propensión de un fármaco a metabolizarse cuando entra en contacto por primera vez con el hígado, es decir, durante su primer paso por el hígado.

«Volumen de distribución» significa el grado de retención de un fármaco a través de los diversos compartimentos del cuerpo, como, p. ej., espacios intracelulares y extracelulares, tejidos y órganos, etc. y la distribución del fármaco dentro de estos compartimentos.

«Grado de unión a suero sanguíneo» significa la propensión de un fármaco para interactuar y unirse a proteínas de suero sanguíneo, tal como albúmina, produciendo una reducción o pérdida de actividad biológica del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, tiempo de retraso (T_{lag}), $T_{máx}$, velocidades de absorción, mayor aparición de efectos y/o $C_{máx}$ para una cantidad determinada de fármaco administrado. «Biodisponibilidad» significa la cantidad de un fármaco en el compartimento de la sangre. «Tiempo de retraso» significa el retraso en el tiempo entre la administración del fármaco y su detección y cuantificabilidad en sangre o plasma.

« $T_{máx}$ » es el tiempo después del cual se alcanza la máxima concentración en sangre del fármaco, y « $C_{máx}$ » es la concentración en sangre máxima obtenida con determinado fármaco. El tiempo para alcanzar una concentración en sangre o tejido del fármaco que se requiere para su efecto biológico está influenciado por todos los parámetros. Los parámetros farmacocinéticos de anticuerpos biespecíficos monocatenarios que muestran especificidad de una especie a otra, que se puede determinar en pruebas preclínicas en animales realizadas en primates no chimpancés,

como se describe más arriba, también se explican, p. ej. en la publicación de Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

5 El término «toxicidad» como se utiliza en la presente memoria se refiere a los efectos tóxicos de un fármaco manifestados en reacciones adversas o reacciones adversas severas. Estas reacciones colaterales podrían referirse a una falta de tolerabilidad del fármaco en general y/o a una falta de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos o carcinogénicos producidos por el fármaco.

10 Los términos «seguridad», «seguridad *in vivo*» o «tolerabilidad» como se utilizan en la presente memoria definen la administración de un fármaco sin inducir reacciones adversas severas directamente después de la administración (tolerancia local) y durante un periodo más prolongado de aplicación del fármaco. La «seguridad», «seguridad *in vivo*» o «tolerabilidad» se pueden evaluar, p. ej. en intervalos regulares durante el tratamiento y período de seguimiento. Las mediciones incluyen evaluación clínica, p. ej. manifestaciones orgánicas, y cribado de anormalidades de laboratorio. Se puede llevar a cabo la evaluación clínica y se pueden registrar/codificar las
15 desviaciones respecto de los hallazgos normales según los estándares NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones orgánicas pueden incluir criterios tales como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se expone, p. ej. en los Common Terminology Criteria (Criterios de Terminología Común) para reacciones adversas v3.0 (CTCAE). Los parámetros de laboratorio que se pueden analizar incluyen, por ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y análisis de otros fluidos
20 corporales tales como suero, plasma, fluido linfático o cerebroespinal, licor y similares. Por lo tanto, la seguridad se puede evaluar, p. ej. mediante exploración física, técnicas de diagnóstico por imagen (es decir, ultrasonido, rayos X, exploraciones por TAC, imagen por resonancia magnética (MRI, por su sigla en inglés), otras medidas con dispositivos técnicos (es decir, electrocardiograma), signos vitales, midiendo parámetros de laboratorio y registrando reacciones adversas. Por ejemplo, las reacciones adversas en primates no chimpancés en los usos y
25 procedimientos de acuerdo con la invención se pueden examinar mediante procedimientos histopatológicos y/o histoquímicos.

El término «dosis efectiva» se define como una cantidad suficiente para conseguir o al menos parcialmente conseguir el efecto deseado. El término «dosis terapéuticamente efectiva» se define como una cantidad suficiente
30 para curar o al menos parcialmente detener la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la infección y del estado general del sistema inmune propio del sujeto. El término «paciente» incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben o bien tratamiento profiláctico o terapéutico.

35 El término «dosis efectiva y no tóxica» como se utiliza en la presente memoria se refiere a una dosis tolerable de un anticuerpo biespecífico de la invención que es lo suficientemente elevada como para producir la disminución de las células patológicas, la eliminación del tumor, la reducción del tumor o la estabilización de la enfermedad sin o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Dichas dosis efectivas y no tóxicas se pueden determinar p. ej. mediante estudios con escalonado de dosis descritos en la técnica y deberían ser inferiores a la dosis que induce
40 reacciones adversas colaterales graves (toxicidad limitante de dosis, DLT, por su sigla en inglés).

También se hace referencia a los términos mencionados en p. ej. la evaluación de seguridad preclínica de medicamentos derivados de biotecnología (Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals) S6; la norma tripartita armonizada de ICH (ICH Harmonised Tripartite Guideline); la reunión del Comité director de ICH del 16 de julio de 1997.

5 La dosificación apropiada, o cantidad terapéuticamente efectiva, del anticuerpo biespecífico de la invención dependerá de la afección que se ha de tratar, de la gravedad de la afección, de la terapia anterior, y de la historia clínica y respuesta al agente terapéutico del paciente. La dosis apropiada se puede ajustar de acuerdo con el juicio del médico responsable de modo que se pueda administrar al paciente una vez o en una serie de dosis. La
10 composición farmacéutica se puede administrar como terapia única o en combinación con terapias adicionales tales como terapias contra el cáncer según sea necesario.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención resultan particularmente útiles para administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular y/o intrasinoval. La administración parenteral
15 puede ser por inyección en bolo o infusión continua.

Si la composición farmacéutica se ha liofilizado, el material liofilizado primero se reconstituye en un líquido apropiado antes de su administración. El material liofilizado se puede reconstituir en, p. ej. agua bacteriostática para inyección (BWFI, por su sigla en inglés), solución salina fisiológica, salina tamponada de fosfato (PBS, por su sigla en inglés),
20 o la misma formulación en la que había estado la proteína antes de la liofilización.

Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de la invención o producido mediante un proceso de la invención se usa para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada de entre una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad
25 autoinmune/trastorno inmunológico.

Un aspecto alternativo de la invención ofrece un procedimiento para el tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada de entre una enfermedad proliferativa, una enfermedad tumoral, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmune/trastorno inmunológico que comprende la etapa de
30 administrar a un paciente que lo necesite el anticuerpo biespecífico de la invención o producido mediante un proceso de la invención.

Las formulaciones descritas en la presente memoria son útiles como composiciones farmacéuticas en el tratamiento y/o prevención de la afección médica patológica como se describe en la presente memoria en un paciente que las
35 necesite. El término «tratamiento» se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas de profilaxis o preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o administración de la formulación al cuerpo, un tejido aislado, o célula de un paciente que padece una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno, o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, paliar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, superar o afectar la enfermedad, el síntoma de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad.
40

Aquellos «que necesiten el tratamiento» incluyen a aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se ha de prevenir el trastorno. El término «enfermedad» se refiere a cualquier afección que se beneficiaría de tratamiento con la formulación de proteína descrita en la presente memoria. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellos estados patológicos que predisponen al mamífero a la enfermedad en cuestión. Entre los ejemplos no restrictivos de enfermedades/trastornos que se han de tratar en la presente memoria se incluyen enfermedades proliferativas, enfermedades tumorales, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes/trastornos inmunológicos.

En otro aspecto, se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo biespecífico de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula huésped de la invención. El kit puede comprender uno o más viales que contienen el anticuerpo biespecífico y las instrucciones de uso. El kit también puede contener medios para administrar el anticuerpo biespecífico de la presente invención tales como jeringa, bomba, infusor o similar.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1 (1)-1(3): Análisis de unión con FACS de constructos de anticuerpo biespecífico designados a células CHO que expresan PSMA humano como se describe en el Ejemplo 1, y la línea de linfocitos T CD3+ humano HPB-ALL, respectivamente. La tinción con FACS se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1. Las líneas gruesas (oscuras) representan células incubadas con sobrenadante de cultivo celular de células transfectadas que expresan los constructos de anticuerpo biespecífico. Los histogramas claros (grises) muestran los controles negativos. El sobrenadante de células CHO no transfectadas se utilizó como control negativo.

Figuras 2(1)-2(2): La figura muestra los resultados de ensayos de liberación de cromo que miden la actividad citotóxica inducida por constructos de anticuerpo biespecífico designados redirigidos a una línea de células CHO transfectadas con PSMA humano. Como células efectoras se utilizaron linfocitos T CD8+ humanos estimulados. Los ensayos se realizaron en RPMI 1640 complementados con HSA al 10 % y se describen en el Ejemplo 2.

Figura 3: Análisis de citotoxicidad de moléculas de EpCAM BiTE® en forma no modificada o como fusión con SA21 o con HSA. Se generaron curvas de respuesta a dosis con adición de FCS, sin adición de FCS, con adición de seroalbúmina humana al 10 % y con adición de seroalbúmina humana al 20 %.

Figura 4: Análisis de citotoxicidad de moléculas de EpCAM BiTE® en forma no modificada o como fusión con SA21 o con HSA. Se generaron curvas de respuesta a dosis con adición de 8 g/l de HSA, con adición de 20 g/l de FCS, con adición de 10 % de seroalbúmina y con adición de 20 % de seroalbúmina.

Figura 5: Los diagramas de las Figuras 5(1) a 5(6) muestran los resultados de ensayos de citotoxicidad basados en FACS que miden la actividad citotóxica inducida por constructos de anticuerpo biespecífico designados redirigidos a una línea de células CHO transfectadas con VIH gp140. Como células efectoras se utilizaron linfocitos T CD8+ humanos estimulados. Los ensayos se llevaron a cabo en RPMI 1640 complementados con FCS al 10 % (5(1), 5(3) y 5(5)) o suero humano al 50 % (5(2), 5(4) y 5(6) respectivamente y se describen en el Ejemplo 9.

Figura 6: Los diagramas del experimento Biacore de HSA/MSA (resonancia de plasmones superficiales) muestran análisis de afinidad de constructos de anticuerpo biespecífico designados a HSA o MSA inmovilizadas respectivamente. Los experimentos Biacore se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 10. Los diagramas muestran las características de asociación y disociación de constructos biespecíficos designados en distintas concentraciones.

Figura 7: Análisis de afinidad de experimento Biacore (resonancia de plasmones superficiales) de CD3 humano de constructos de anticuerpo biespecífico designados a CD3 humano inmovilizado. Los experimentos Biacore se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 11. Los diagramas muestran las características de asociación y disociación de constructos biespecíficos designados en distintas concentraciones.

Figura 8: Análisis de afinidad de constructos de anticuerpo biespecífico designados a CD3 humano inmovilizado. Los experimentos Biacore se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 12. Los diagramas muestran las características de asociación y disociación de constructos biespecíficos designados en distintas concentraciones.

Figura 9: Perfil SEC de CD4(1+2)xαCD3LxSA21 El diagrama muestra el perfil de exclusión por tamaño de CD4(1+2)xαCD3LxSA21. Se indican picos de formas de agregado, multimérica y monomérica. La línea azul indica absorción óptica a 280 nm. El procedimiento de purificación se describe en el Ejemplo 13.

20 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Estos ejemplos no deberían interpretarse como restrictivos del alcance de la presente invención. Los ejemplos se incluyen con fines ilustrativos y la presente invención está limitada únicamente por las reivindicaciones.

25 Ejemplo 1: Unión biespecífica y reactividad cruzada entre especies

Para citometría de flujo se utilizaron células CHO diana transfectadas con PSMA humano (el procedimiento general para la transfección de células CHO con moléculas de superficie celular para crear células diana apropiadas se deriva de la publicación internacional WO 2008/119567). Se incubaron 200.000 células de las líneas celulares respectivas durante 30 minutos sobre hielo con 50 µl de moléculas biespecíficas purificadas a una concentración de 5 µg/ml. Las células se lavaron dos veces en PBS con FCS al 2 % y se detectó unión de los constructos con un anticuerpo PentaHis murino (Qiagen; diluido 1:20 en 50 µl de PBS con FCS al 2 %). Después del lavado, los anticuerpos unidos PentaHis se detectaron con un anticuerpo específico Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluidos 1:100 en PBS con FCS al 2 %.

La Figura 1 muestra los histogramas de dichos análisis FACS. Los resultados con respecto a la detección de unión al PSMA diana y a CD3 se resumen en las tablas adjuntas 3 y 4. Las variantes parentales de las moléculas BiTE® identificadas sin un ABP se describen en detalle, incluyendo ejemplos específicos para la secuencia de aminoácidos, en la publicación internacional WO 2010/037836.

Tabla 3: Características de unión de moléculas de anticuerpo PSMA BiTE® con ABP en el extremo N.

Constructo	Unión a PSMA	Unión a CD3
AB01 x PSMA x CD3	-	+
AB14 x PSMA x CD3	-	+
AB156 x PSMA x CD3	-	+
DX236 x PSMA x CD3	-	+
DX321 x PSMA x CD3	-	+
SA04 x PSMA x CD3	-	+
SA08 x PSMA x CD3	-	+
SA21 x PSMA x CD3	-	+
SA25 x PSMA x CD3	-	+

Tabla 4: Características de unión de moléculas de anticuerpo PSMA BiTE® con ABP en el extremo C.

5

Constructo	Unión a PSMA	Unión a CD3
PSMA x CD3 x AB01	+	+
PSMA x CD3 x AB14	+	+
PSMA x CD3 x AB156	+	+
PSMA x CD3 x DX236	+	+
PSMA x CD3 x DX321	+	+
PSMA x CD3 x SA04	+	+
PSMA x CD3 x SA08	+	+
PSMA x CD3 x SA21	+	+
PSMA x CD3 x SA25	+	+

Ejemplo 2: Actividad citotóxica

Ensayo de liberación de cromo con linfocitos T humanos estimulados

10

Se obtuvieron linfocitos T estimulados enriquecidos para linfocitos T CD8⁺ como se describe a continuación.

15

Una placa de Petri (145 mm de diámetro, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster) se recubrió con un anticuerpo anti-CD3 disponible en el mercado (OKT3, Orthoclone) con una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37°C. La proteína no unida se retiró mediante una etapa de lavado con PBS. Se agregaron PBMC humanas 3 - 5 x 10⁷ a la placa de Petri precubierta en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / FCS al 10 % / IL-2 20 U/ml (Proleukin®, Chiron) y se estimularon durante 2 días. El tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se agregó IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron nuevamente durante un día en el mismo medio de cultivo celular indicado anteriormente.

20

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) se enriquecieron mediante disminución de linfocitos T CD4⁺ y células NK CD56⁺ utilizando Dynal-Beads de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 Las células diana CHO transfectadas con PSMA de humano o de macaco (el procedimiento general para la transfección de células CHO con moléculas de superficie celular para crear células diana apropiadas se deriva de la publicación internacional WO 2008/119567) se lavaron dos veces con PBS y se etiquetaron con 11,1 MBq 51Cr con un volumen final de 100 µl de RPMI con FCS al 50 % durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana etiquetadas se lavaron 3 veces con 5 ml de RPMI y luego se utilizaron en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos con un volumen total de 200 µl de RPMI complementario (como se indica más arriba) con una proporción E:T de 10:1. Se utilizaron una concentración inicial de 0,01 - 1 µg/ml de anticuerpo biespecífico purificado y diluciones triples de este. El tiempo de incubación para el ensayo fue de 18 horas. Se determinó la citotoxicidad como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante respecto de la diferencia de lisis máxima (adición de Triton-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado. La medición de actividad del cromo en los sobrenadantes se llevó a cabo en un contador gamma 15 Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Köln, Alemania). El análisis de los resultados se llevó a cabo con Prism 5 para Windows (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos). Los valores EC₅₀ calculados mediante el programa de análisis a partir de las curvas sigmoideas de respuesta a dosis se utilizaron para comparar la actividad citotóxica.

20 Los resultados para la destrucción de las células diana que expresan PSMA se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 3: Determinación basada en Biacore de afinidad de anticuerpo BiTE® a seroalbúmina de distintas especies

25 Para confirmar la unión de las moléculas PSMA BiTE® etiquetadas a seroalbúmina humana y seroalbúminas de otras especies, se proporcionaron las siguientes preparaciones de seroalbúmina: Seroalbúmina humana (HSA), Sigma A9511; seroalbúmina de macaco Rhesus (RSA), bio World 22070099; seroalbúmina de ratón (MSA), Sigma A3139; seroalbúmina bovina (BSA), Sigma A7906.

30 Los experimentos de unión se llevaron a cabo utilizando mediciones de resonancia de plasmones en un equipo Biacore. En detalle, se inmovilizaron chips de sensor CM5 (GE Healthcare) con la proteína de seroalbúmina respectiva utilizando tampón de acetato a pH 4,5 de acuerdo con el manual del fabricante. Las muestras de anticuerpo BiTE® se cargaron en cinco concentraciones pertinentes, p. ej.: 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM y 3,13 nM diluidas en tampón circulante HBS-EP (GE Healthcare). Para determinar la afinidad, la velocidad de flujo fue de 35 µl/min durante 3 min, a continuación, se aplicó tampón circulante HBS-EP durante 10 min de nuevo a una 35 velocidad de flujo de 35 µl/ml. La regeneración del chip se llevó a cabo mediante un tampón que consiste en disolución de pH 3,0 de NaCl 0,5 M con 100 mM de glicina. Los grupos de datos se analizaron con software BiaEval. En algunos casos las curvas de unión podían perfectamente o no corresponderse con las curvas teóricas subyacentes del software de evaluación. En el último caso, la unión se determinó como «positiva»; en el caso de correspondencia más cercana, se presentan los números, pero se han de considerar una aproximación.

40

Las afinidades de unión de los anticuerpos BiTE® respectivos a seroalbúmina de distintas especies como se determina mediante Biacore se resumen en la Tabla 5.

5 Tabla 5: Afinidades (KD) de anticuerpo PSMA BiTE® etiquetado contra seroalbúminas de distintas especies medidas en experimentos Biacore (resonancia de plasmones superficiales).

Anticuerpo BiTE®	KD [nM] HSA	KD [nM] RSA	KD [nM] MSA	KD [nM] BSA
PSMA x SA04	negativa	positiva	positiva	negativa
PSMA x SA08	116	42	77	434
PSMA x SA21	137	49	70	positiva
PSMA x SA25	1650	95	147	positiva
PSMA x DX236	3060	negativa	negativa	negativa
PSMA x DX321	positiva	positiva	negativa	negativa
PSMA x AB01	17400	810	negativa	negativa
PSMA x AB14	282	94	negativa	negativa
PSMA x AB156	426	96	negativa	negativa

HSA = seroalbúmina humana, RSA = seroalbúmina de macaco rhesus, MSA = seroalbúmina de ratón, BSA = seroalbúmina bovina. «Positiva» significa unión detectable que no se pudo determinar con precisión mediante el software BiaEval; «Negativa» significa unión no significativa en las condiciones de experimento elegidas.

10 Como se representa en la Tabla 5, todos los anticuerpos MiTE PSMA evaluados que contienen distintas etiquetas de péptidos de unión a suero mostraron unión significativa a seroalbúmina humana con la excepción de PSMA x SA04 que dieron negativo en seroalbúmina humana, pero mostraron unión distinta a seroalbúmina de macaco rhesus. Asimismo, todos los anticuerpos BiTE etiquetados evaluados mostraron unión distinta a seroalbúmina de macaco rhesus, salvo PSMA-DX236. Además, de los anticuerpos BiTE evaluados, PSMA x SA04, PSMA x SA08, PSMA x SA21 y PSMA x SA25 mostraron unión distinta a seroalbúmina de ratón, mientras que PSMA x DX236, PSMA x DX321, PSMA x AB1, PSMA x AB14 y PSMA x AB156 no mostraron unión significativa a seroalbúmina murina.

15 Entre las moléculas evaluadas, solo PSMA x SA08, PSMA x SA21 y PSMA x SA25 mostraron unión distinta a seroalbúmina bovina.

Ejemplo 4: Esquema de purificación de anticuerpos BiTE® con/sin un ABP de extremo C-terminal.

20 Se cultivaron células CHO de ovario de conejillo de Indias chino estables transfectadas con un vector pEF DHFR que codifica la secuencia de anticuerpo BiTE® en botellas tipo roller hasta alcanzar 60 % de vitalidad restante. Se despejó el sobrenadante de cultivo celular mediante filtración de 0,2 µm y se aplicó a una columna rellena con un gel quelante cargado con zinc Fractogel EMD Chelate (Merck, Darmstadt) para captura de cromatografía de afinidad por
25 metales inmovilizados (IMAC, por su sigla en inglés).

Después de cargar la muestra, se lavó el sobrenadante de cultivo celular restante y después de una etapa de pre-elución, los anticuerpos BiTE® etiquetados con HIS6 se eluyeron aplicando un tampón que contiene 500 mM de imidazol.

- 5 El volumen eluido que contiene los anticuerpos BiTE® se proporcionó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) Superdex S200 (GE Healthcare, Munich) para separar la proteína monomérica BiTE® de la proteína dimérica BiTE® y otras proteínas.

10 Las fracciones que contienen la proteína monomérica BiTE® se agruparon y se determinó la concentración de proteína midiendo absorción óptica a una longitud de onda de 280 nm y longitud de paso de luz de 1 cm y multiplicando por el factor de absorción específico de secuencia de proteína.

15 El porcentaje de monómeros BiTE® se calculó mediante el área debajo de la curva en los cromatogramas SEC del dímero BiTE® y fracción monomérica BiTE®. Porcentaje de monómeros = (Área de monómero / (Área monómero + Área dímero))* 100.

20 Como resulta aparente de las tablas que se muestran a continuación (Tablas 6 a 8) para todas las variantes de anticuerpos BiTE® evaluadas de BiTE® anti PSMA y EpCAM BiTE® antihumanas se consiguieron rendimiento de proteína monomérica BiTE® y porcentaje de monómeros favorables.

Tabla 6: Rendimiento de monómeros de anticuerpo BiTE® y porcentaje de monómeros de variantes de BiTE® anti-PSMA equipadas con un péptido de unión a albúmina ABP con un extremo C-terminal añadido que muestra rendimiento favorable y porcentaje de monómeros por encima de 80 %.

Anticuerpo BiTE®	Rendimiento de monómeros [µg/L sobrenadante]	% de monómeros de anticuerpo BiTE®
PSMA x CD3 x SA04	3070	90
PSMA x CD3 x SA08	2243	85
PSMA x CD3 x SA21	1537	84
PSMA x CD3 x SA25	3384	85
PSMA x CD3 x AB01	2572	92
PSMA x CD3 x AB14	4337	88
PSMA x CD3 x AB156	2605	93
PSMA x CD3 x DX236	716	87
PSMA x CD3 x DX321	13392	85

25 Tabla 7: Resultados del cribado con citometría de flujo de muestras de sobrenadantes de cultivo celular de variantes de BiTE® anti PSMA, equipadas con péptido de unión a albúmina ABP con un extremo n-terminal añadido para unirse a células que expresan el antígeno PSMA antes de la purificación. Todos los sobrenadantes de cultivo celular que no muestran ninguna unión en este ensayo se excluyeron del procedimiento de purificación.

30

Anticuerpo BiTE®	Unión con FACS	Porcentaje de monómeros
SA04 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
SA08 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
SA21 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
SA25 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
AB01 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
AB14 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
AB156 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
DX232 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
DX236 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-
DX321 x PSMA x CD3	Proteína no funcional (FACS)	-

Tabla 8: Rendimiento de monómeros de anticuerpo BiTE y porcentaje de monómeros de variante EpCAM BiTE® antihumana equipada con un péptido de unión a albúmina ABP con extremo C-terminal añadido que muestra rendimiento favorable y porcentaje de monómeros por encima de 80 %.

5

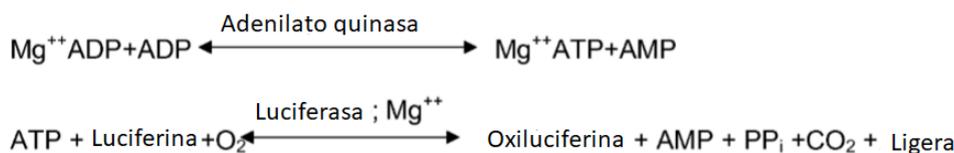
Molécula BiTE®	Rendimiento de monómeros [µg/L sobrenadante]	% de monómeros de anticuerpo BiTE®
EpCAM x CD3 x SA21	4390	91

Ejemplo 5: Moléculas EpCAM BiTE® humanas

Los ejemplos de moléculas EpCAM BiTE® parentales humanas se describen en la publicación internacional WO 2005/040220.

La bioactividad de las EpCAM BiTE® se evaluó en un ensayo basado en células utilizando el kit Toxilight BioAssay (Cambrex/Lonza). Este kit permite medir el efecto citotóxico de PBMC humanas (células efectoras) en la línea celular de cáncer de mama que expresa EpCAM en presencia de EpCAM BiTE®, mediante cuantificación de células muertas de acuerdo con el siguiente principio:

El ensayo se basó en medición de bioluminiscencia de la enzima adenilato quinasa (AK). AK estaba presente en todas las células. La pérdida de integridad de membrana celular mediante células muertas da como resultado la pérdida de AK en el medio cercano. La adición del reactivo Toxilight (que contiene ADP y la enzima luciferasa) desencadena una reacción de dos etapas que resulta en emisión de luz, que se puede medir utilizando un luminómetro. La luz emitida está linealmente relacionada con la concentración de AK y se correlaciona con la cantidad de células muertas.



Rendimiento y análisis de datos:

5 Se co-cultivan células efectoras (PBMC humana, 2×10^6 /pocillo) y diana (MDA-MB-453, 1×10^5 /pocillo) en una proporción efectora/diana de 20:1 en presencia de distintas concentraciones de EpCAM BiTE® (250 ng/mL - 4,2 pg/mL). Al cabo de 16 a 20 horas se añade el reactivo ToxiLight y se mide la luminiscencia (para descripción detallada véase SOP-BIA-110-012).

10 Se calcula el % de lisis específica para cada concentración de EpCAM BiTE® y los datos se ajustan para determinar citotoxicidad media-máxima (EC_{50}). Si bien el valor EC_{50} describe la potencia biológica de EpCAM BiTE®, los valores absolutos pueden variar, lo cual es normal para un ensayo basado en células con distintos donantes de células efectoras. Por lo tanto, una potencia relativa se calcula para cada análisis de respuesta a dosis en comparación con un estándar de trabajo de EpCAM BiTE® según la siguiente fórmula:

15

$$\text{Potencia relativa} = \text{ejemplo } EC_{50} / \text{estándar } EC_{50}$$

La validez de la determinación de potencia relativa se controla mediante distintos parámetros, p. ej. ajuste de curva, proporción de amplitudes de curvas, proporción de pendientes, etc.

20

Las condiciones de ensayo de citotoxicidad iniciales no contienen HSA puesto que el ensayo se desarrolla para evaluar material de prueba clínica con el fin de determinar liberación y estabilidad.

25 Se evaluó la adición de seroalbúmina y la bioactividad relativa del constructo EpCAM BiTE®-SA21 fue 51-66 % para la condición de suero al 10 % y 59-66 % para la condición de suero al 20 % (Tabla 13). Por lo tanto, la reducción de bioactividad añadiendo de manera covalente el péptido de unión a HSA y utilizando las condiciones descritas estuvo dentro del intervalo 50-60 %.

30 Se observó una reducción más pronunciada en bioactividad relativa para el constructo EpCAM BiTE que contenía la HSA enlazada de manera covalente. Pero también en este caso la bioactividad no se bloqueó por completo; las bioactividades restantes fueron 19-31 % y 24-29 % para condiciones de suero al 10 y 20 % (Tabla 14).

Las condiciones de ensayo distintas, como adición de FCS o HSA no alteraron el efecto observado en la bioactividad relativa (Tabla 9).

35

Las curvas de respuesta a dosis de los experimentos descritos se muestran en las Figuras 3 y 4.

Tabla 9: Valores EC_{50} para variantes EpCAM BiTE®

EC ₅₀ [pM]			
	EpCAM BiTE®	-SA21	-HSA
con FCS	25	22	176
sin FCS	(864)	602	2147
suero hu al 10 %	69	105	358
suero hu al 20 %	99	169	406
EC ₅₀ [pM]			
	EpCAM BiTE®	-SA21	-HSA
8 g/l HSA	428	409	566
20 g/l HSA	128	367	567
suero hu al 10 %	217	425	700
suero hu al 20%	263	400	918

Tabla 10: Bioactividad relativa comparada con EpCAM BiTE® no modificado

EpCAM BiTE®-SA21	
suero hu al 10 %	51 %
suero hu al 20 %	66 %
EpCAM BiTE®-SA21	
suero hu al 10 %	66 %
suero hu al 20 %	59 %

5

Tabla 11: Bioactividad relativa comparada con EpCAM BiTE® no modificado

EpCAM BiTE®-HSA	
suero hu al 10 %	19 %
suero hu al 20 %	24 %
EpCAM BiTE®-HSA-	
suero hu al 10 %	31 %
suero hu al 20 %	29 %

Ejemplo 7: Generación de células CHO que expresan VIH gp140 transfectadas de forma estable

10

El dominio extracelular de VIH gp160 (gp140) de la cepa VIH-1 HXB2 (Uniprot KB, N.º de acceso P04578) se fusionó con el dominio transmembrana e intracelular de EpCAM. El marco de lectura abierto de esta proteína de fusión se clonó en un vector pEF DHFR de acuerdo con procedimientos estándar (el procedimiento general para la transfección de células CHO con las moléculas de superficie celular para crear células diana apropiadas se deriva de la publicación internacional WO 2008/119567) y luego se utilizó para los análisis de los constructos biespecíficos designados.

15

Ejemplo 8: Generación de constructos biespecíficos de VIH

El dominio de unión diana de VIH de los constructos biespecíficos descritos a continuación son de origen en CD4 humano. Los constructos denominados CD4(1+2) contienen los primeros dos dominios de CD4 humano. Los constructos CD4 D1,1 o CD4 D1,2 son de origen de dominio 1 de CD4 humano y contienen mutaciones puntuales únicas y son descritos por Chen, W., et al. (2011, J Virol 85(18): 9395-9405). Los dos constructos descritos en la presente memoria representan la prueba de su aplicabilidad en el contexto BiTE, pero no se limitan a estos dos constructos de dominio 1 CD4, es decir, el formato biespecífico descrito se puede aplicar a todas las variantes descritas de estos, especialmente las variantes publicadas CD4 D1,3 a CD4 D1,19. Generalmente, las moléculas con restos de unión intrínsecos a proteínas de VIH accesibles en la membrana plasmática son aplicables en el contexto biespecífico, p. ej. los constructos que contienen solo partes de CD4 humano como la secuencia de péptidos principal, aptámeros de la proteína CD4 humana o quimeras de p. ej. CD4 de rata con inserciones de CD4 humano implicado en unión a gp120 como lo ilustran James H. M. Simon (1993, J. Exp. Med, Volumen 177, abril 1993, 949-954) se pueden utilizar en el contexto de BiTE. Cerca de los dominios de unión de origen en CD4 humano, las especificidades de anticuerpo de anticuerpos monoclonales humanos anti VIH tales como B12, VRC01 o 4E10 en formato scFv con orientación VH-VL o VL-VH también son aplicables en el contexto de BiTE y se han caracterizado en cuanto a su unión biespecífica y actividad citotóxica. Los dominios de unión a VIH gp120 descritos se fusionaron en un ligador de CD3 humano inter-específico. La versión de larga duración de estos constructos específicos de VIH parentales se ha diseñado y clonado de acuerdo con procedimientos estándar y se caracterizan más adelante.

Ejemplo 9: Constructos biespecíficos de actividad citotóxica para células diana con VIH positivo

Ensayo de citotoxicidad basado en FACS con linfocitos T humanos estimulados: Se obtuvieron linfocitos T estimulados enriquecidos para linfocitos T CD8⁺ como se describe a continuación.

Una placa de Petri (145 mm de diámetro, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster) se recubrió con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible en el mercado (OKT3, Orthoclone) y anti-CD28 (N.º art. 340975, BD) con una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. Se retiró la proteína no unida mediante una etapa de lavado con PBS. Se agregaron PBMC humanas 3 - 5 x 10⁷ a la placa de Petri precubierta en 100 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / FCS al 10 % / IL-2 20 U/ml (Proleukin®, Chiron) y se estimularon durante 3 días. El tercer día, las células se recogieron y se lavaron una vez con RPMI 1640. Se agregó IL-2 a una concentración final de 20 U/ml y las células se cultivaron nuevamente durante un día en el medio de cultivo celular indicado anteriormente.

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) se enriquecieron mediante disminución de células no CD8⁺ utilizando un kit de aislamiento de linfocitos T CD8⁺ humanos de acuerdo con el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec).

Las células diana CHO transfectadas con VIH gp140 (el procedimiento general para la transfección de células CHO con moléculas de superficie celular para crear células diana apropiadas se deriva de la publicación internacional WO 2008/119567) se lavaron con PBS más FCS al 2 % y se etiquetaron con disolución de etiquetado de células Vybrant® DiD (Invitrogen, 125.000 células/ml, 5 µl colorante cada 10⁶ células) con PBS más FCS al 2 % durante 3

minutos a 37 °C. Posteriormente, las células diana etiquetadas se lavaron 3 veces con 50 ml de PBS más FCS al 2 % y luego se utilizaron en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos con un volumen total de 200 µl de medio RPMI complementario (como se indica más arriba) con una proporción Efectoras/Diana de 10:1. Se utilizaron una concentración inicial de 2 -10 µg/ml de anticuerpo biespecífico purificado y diluciones triples a cuádruples de este. El tiempo de incubación para el ensayo fue 18-24 horas.

Después de la incubación, las células se volvieron a poner en suspensión y se transfirieron a una placa de fondo en V de 96 pocillos. Las células diana agregadas se tripsinizaron durante 5 minutos a 37 °C, se volvieron a poner en suspensión en PBS / FCS al 2 % y se combinaron con las otras células de los pocillos respectivos. Las placas se centrifugaron durante 4 minutos a 1.200 rpm, el sobrenadante se descartó y las células se volvieron a poner en suspensión en PBS más FCS al 2 % más 1 µg/ml de yoduro de propidio (PI) (suministrado por Sigma Aldrich). La citotoxicidad se determinó como porcentaje de células doble positivo DID/PI respecto del número total de células DiD positivo según se determinó mediante citometría de flujo utilizando un FACSCanto II (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). Todas las mediciones se llevaron a cabo por duplicado. Los análisis de los resultados se llevaron a cabo con Prism 5 para Windows (versión 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos). Los valores EC₅₀ se calcularon mediante el programa de análisis a partir de las curvas sigmoideas de respuesta a dosis o pendiente variable y luego se utilizaron para comparar la actividad citotóxica.

Los resultados para la actividad citotóxica utilizando RPMI 1640 complementado con FCS al 10 % o suero humano al 50 % (PAA Laboratories GmbH, N.º art. C11-021) respectivamente en células diana que expresan VIH gp140 se muestran en la Figura 5(1)-5(4).

Los valores EC₅₀ (es decir, concentración de BiTE® a lisis media máxima de células diana) se muestran para las moléculas biespecíficas designadas en las Tablas 12 a 17 para ilustrar su actividad citotóxica.

Tabla 12: Valores EC₅₀ de anticuerpos BiTE® etiquetados con ABP en extremo N-terminal bajo la influencia de FCS al 10 %

BiTE®	CD4(1+2)xaCD3	SA21xCD4(1+2)xaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	0,12	0,93
Factor*	1	7,75
BiTE®	SA21LxCD4(1+2)xaCD3	SA21LxCD4(1+2)xaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	2,0	0,78
Factor*	16,6	6,5
BiTE®	SA25xCD4(1+2)xaCD3	
EC ₅₀ [ng/ml]	0,29	
Factor*	2,41	
Factor* El factor describe la diferencia de valor EC ₅₀ de la molécula biespecífica designada en comparación con la molécula biespecífica parental sin etiqueta ABP.		

Tabla 13: Valores EC₅₀ de anticuerpos BiTE® etiquetados con ABP en extremo N-terminal bajo la influencia de suero humano al 50%

ES 2 680 151 T3

BiTE®	CD4(1+2)xaCD3	SA21xCD4(1+2)xaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	0,24	4,0
Factor*	1	16,6
BiTE®	SA21LxCD4(1+2)xaCD3	SA21LxCD4(1+2)xaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	5,5	2,7
Factor*	22,9	11,25
BiTE®	SAx25CD4(1+2)xaCD3	
EC ₅₀ [ng/ml]	0,78	
Factor*	3,25	
Factor* El factor describe la diferencia de valor EC ₅₀ de la molécula biespecífica designada en comparación con la molécula biespecífica parental sin etiqueta ABP.		

Tabla 14: Valores EC₅₀ de anticuerpos BiTE® etiquetados con ABP en extremo C-terminal bajo la influencia de FCS al 10 %

5

BiTE®	CD4(1+2)xaCD3	CD4(1+2)xaCD3xSA21
EC ₅₀ [ng/ml]	0,12	0,23
Factor*	1	1,92
BiTE®	CD4(1+2)xaCD3LxSA21	CD4(1+2)xaCD3LxSA21
EC ₅₀ [ng/ml]	0,23	0,35
Factor*	1,92	2,92
BiTE®	CD4(1+2)xaCD3xSA25	
EC ₅₀ [ng/ml]	0,21	
Factor*	1,75	
Factor* El factor describe la diferencia de valor EC ₅₀ de la molécula biespecífica designada en comparación con la molécula biespecífica parental sin etiqueta ABP.		

Tabla 15: Valores EC₅₀ de anticuerpos BiTE® etiquetados con ABP en extremo C-terminal bajo la influencia de suero humano al 50%

BiTE®	CD4(1+2)xaCD3	CD4(1+2)xaCD3xSA21
EC ₅₀ [ng/ml]	0,24	1,2
Factor*	1	5
BiTE®	CD4(1+2)xaCD3LxSA21	CD4(1+2)xaCD3LxSA21
EC ₅₀ [ng/ml]	1,2	1,7
Factor*	5	7,08
BiTE®	CD4(1+2)xaCD3xSA25	
EC ₅₀ [ng/ml]	0,74	
Factor*	3,08	
Factor* El factor describe la diferencia de valor EC ₅₀ de la molécula biespecífica designada en comparación con la molécula biespecífica parental sin etiqueta ABP.		

- 5 La comparación de los valores EC₅₀ de moléculas biespecíficas etiquetadas con SA21 en extremo C-terminal (Tabla 15, Figura 5(4)) con las moléculas biespecíficas etiquetadas con SA21 en extremo N-terminal (Tabla 13, Figura 5(2)) indica una influencia negativa significativa en la actividad citotóxica para moléculas biespecíficas etiquetadas con SA21 en extremo N-terminal indicada por valores EC₅₀ superiores en presencia de suero humano al 50 %. Este fenómeno se puede observar sin importar la posición de la etiqueta SA21 en el extremo de la molécula, es decir, sin restauración de actividad citotóxica con la adición de cinco enlazadores AA o 15AA entre la etiqueta ABP y el dominio de unión cercano. En números, las moléculas BiTE® etiquetadas con SA21 en extremo N-terminal muestran un aumento de 11 a 23 veces en actividad citotóxica en comparación con la disminución de 5 a 7 veces cuando la etiqueta SA21 se agrega en el extremo C de la molécula biespecífica. La observación descrita también se puede apreciar en presencia de FCS al 10 %, es decir, menor influencia de seroalbúmina debido a menor número de moléculas y especies diferentes. Una disminución de seis a 16 veces para moléculas biespecíficas etiquetadas con SA21 en extremo N-terminal (Tabla 12) en comparación con una disminución de 2 a 3 veces para anticuerpos BiTE® etiquetados con SA21 en extremo C-terminal (Tabla 14).

20 Tabla 16: Valores EC₅₀ de anticuerpos BiTE® etiquetados con ABP entre el dominio diana y de unión a CD3 bajo la influencia de FCS al 10 %

BiTE®	CD4(1+2)xaCD3	CD4(1+2)SA21xaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	0,055	0,75
Factor*	1	13,64
BiTE®	CD4(1+2)LxSA21LxaCD3	CD4(1+2)LxSA21LxaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	0,99	3,7
Factor*	18	67,28
Factor* El factor describe la diferencia de valor EC ₅₀ de la molécula biespecífica designada en comparación con la molécula biespecífica parental sin etiqueta ABP.		

Tabla 17: Valores EC₅₀ de anticuerpos BiTE® etiquetados con ABP entre el dominio diana y de unión a CD3 bajo la influencia de suero humano al 50 %

BiTE®	CD4(1+2)xaCD3	CD4(1+2)SA21xaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	0,11	5,1
Factor*	1	43,36
BiTE®	CD4(1+2)LSA21LxaCD3	CD4(1+2)LxSA21LxaCD3
EC ₅₀ [ng/ml]	2,9	~8,0
Factor*	26,36	72,72
Factor* El factor describe la diferencia de valor EC ₅₀ de la molécula biespecífica designada en comparación con la molécula biespecífica parental sin etiqueta ABP.		

5 Ubicar la etiqueta SA21 ABP entre las especificidades de unión a CD3 y VIH produce una disminución de actividad citotóxica en presencia de FCS al 10 % según la longitud de la inserción de etiqueta ABP (Tabla 16 y Figura 5(5)). Esta disminución de actividad citotóxica es parcialmente exagerada en presencia de suero humano al 50 % (Tabla 17 y Figura 5(6)).

10 Ejemplo 10: Determinación basada en Biacore de afinidad de anticuerpo BiTE® a seroalbúmina de distintas especies

Para confirmar la unión de las moléculas BiTE® específicas de VIH etiquetadas a seroalbúmina humana y seroalbüminas de otras especies, se proporcionaron las siguientes preparaciones de seroalbúmina: Seroalbúmina humana (HSA), Sigma A9511; seroalbúmina de ratón (MSA), Sigma A3139;

Los experimentos de unión se llevaron a cabo utilizando mediciones de resonancia de plasmones en un equipo Biacore. En detalle, se inmovilizaron chips de sensor CM5 (GE Healthcare) con la proteína de seroalbúmina respectiva utilizando tampón de acetato a pH 3 de acuerdo con el manual del fabricante. Las muestras de anticuerpo BiTE® se cargaron con cinco concentraciones pertinentes, p. ej.: 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM (concentraciones bajas de BiTE®): 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM) diluidas en tampón circulante HBS-EP (GE Healthcare). Para determinar la afinidad, la velocidad de flujo fue de 35 µl/min durante 3 min, a continuación, se aplicó tampón circulante HBS-EP durante 6 min de nuevo a una velocidad de flujo de 35 µl/ml. La regeneración del chip se llevó a cabo mediante un tampón que consiste en disolución de pH 3,0 de NaCl 0,5 M con 100 mM de glicina durante 60 segundos. Los grupos de datos se analizaron con el software BiaEval. En algunos casos las curvas de unión podían perfectamente o no corresponderse con las curvas teóricas subyacentes del software de evaluación. En el último caso, la unión se determinó como «positiva»; en el caso de correspondencia más cercana, se presentan los números, pero se han de considerar una aproximación.

30 Las afinidades de unión de los anticuerpos BiTE® respectivos a HSA según se determina mediante Biacore se resumen en la Tabla 18 y la Figura 6.

Tabla 18: Afinidades (KD) de anticuerpo VIH BiTE® etiquetado contra seroalbúmina humana medidas en experimentos Biacore (resonancia de plasmones superficiales). HSA = seroalbúmina humana, MSA = seroalbúmina de ratón, «Positiva» significa unión detectable que no se pudo determinar con precisión mediante el software BiaEval; «Negativa» significa unión no significativa en las condiciones de experimento elegidas.

5

Anticuerpo BiTE®	KD [nM] HSA	KD [nM] MSA
CD4(1+2)xaCD3	Negativa	Negativa
SA21CD4(1+2)xaCD3	226	87
SA21LCD4(1+2)xaCD3	536	72
SA21LxCD4(1+2)xaCD3	260	107
SA25CD4(1+2)xaCD3	Positiva	Positiva
CD4(1+2)xaCD3SA21	201	113
CD4(1+2)xaCD3LSA21	Positiva	Positiva
CD4(1+2)xaCD3LxSA21	Positiva	Positiva
CD4(1+2)xaCD3SA25	198	63
CD4(1+2)SA21aCD3	465	70
CD4(1+2)LSA21LaCD3	773	231
CD4(1+2)LxSA21LxI2C	4520	8210

En cuanto a la afinidad de las moléculas biespecíficas etiquetadas con ABP todas se unen a las proteínas de HSA y MSA inmovilizadas. Las moléculas biespecíficas que albergan la etiqueta ABP entre sus especificidades de unión mostraron peores afinidades a HSA y MSA que las moléculas biespecíficas etiquetadas con SA21 o SA 25 en cualquiera de sus extremos.

10

Ejemplo 11: Determinación basada en Biacore de afinidad de anticuerpo BiTE® a CD3 humano

Para confirmar la unión de las moléculas VIH BiTE® etiquetadas con ABP en el extremo terminal C a CD3 humano, un péptido CD3 humano que comprende el epítipo CD3 se fusionó con Fc humano de acuerdo con procedimientos estándar y se utilizó para la medición de afinidad.

15

Los experimentos de unión se llevaron a cabo utilizando mediciones de resonancia de plasmones en un equipo Biacore. En detalle, se inmovilizaron chips de sensor CM5 (GE Healthcare) con la proteína CD3 x huFc humana utilizando tampón de acetato a pH 4,5 de acuerdo con el manual del fabricante. Las muestras de anticuerpo BiTE® se cargaron con cinco concentraciones pertinentes, p. ej.: 50 nM, 25 nM, 12,5nM, 6,25 nM, 3,125 nM diluidas en tampón circulante HBS-EP (GE Healthcare). Para determinar la afinidad, la velocidad de flujo fue de 35 µl/min durante 3 min, a continuación se aplicó tampón circulante HBS-EP durante 8 min de nuevo a una velocidad de flujo de 35 µl/ml. La regeneración del chip se llevó a cabo mediante un tampón que consiste en disolución de pH 1,5 de NaCl 0,5 M con 100 mM de glicina durante 60 segundos. Los grupos de datos se analizaron con BiaEval Software.

20

25

Tabla 19: Afinidades (KD) de anticuerpo VIH BiTE® etiquetado contra proteína CD3 FC humana medidas en experimentos Biacore (resonancia de plasmones superficiales).

Anticuerpo BiTE®	KD [nM] huCD3	Factor*
CD4(1+2)xaCD3	2,31	1
CD4(1+2)xaCD3xSA21	4,33	1,9
CD4(1+2)xaCD3xSA25	3,77	1,6
Factor* Afinidad de CD3 reducida en comparación con molécula BiTE® parental sin etiqueta ABP		

La adición en extremo C-terminal de una etiqueta ABP produce una disminución máxima de 2 veces de la especificidad de unión cercana (es decir, CD3), véanse Tabla 19 y Figura 7.

5

Ejemplo 12: Determinación basada en Biacore de afinidad de anticuerpo BiTE® a VIH gp120

Para confirmar la unión de las moléculas VIH BiTE® etiquetadas con ABP a VIH gp120, se proporcionó el siguiente VIH gp120: Glicoproteína de envoltura gp160 VIH-1 IIIB recombinante (Baculovirus), N.º Producto 1001, Immunodiagnosics, Incorporation.

10

Los experimentos de unión se llevaron a cabo utilizando mediciones de resonancia de plasmones en un equipo Biacore. En detalle, se inmovilizaron chips de sensor CM5 (GE Healthcare) con la proteína VIH gp120 respectiva utilizando tampón de acetato a pH 4,5 de acuerdo con el manual del fabricante. Las muestras de anticuerpo BiTE se cargaron con cinco concentraciones pertinentes, p. ej.: 100nM, 50 nM, 25 nM, 12,5nM, 6,25 nM, 3,125 nM diluidas en tampón circulante HBS-EP (GE Healthcare). Para determinar la afinidad, la velocidad de flujo fue de 35 µl/min durante 3 min, a continuación, se aplicó tampón circulante HBS-EP durante 7 min de nuevo a una velocidad de flujo de 35 µl/ml. La regeneración del chip se llevó a cabo mediante un tampón que consiste en disolución de MgCl2 4 M durante 60 segundos. Los grupos de datos se analizaron con el software BiaEval.

15

20

Tabla 20: Afinidades (KD) de anticuerpo VIH BiTE® etiquetado contra proteína VIH gp120 medidas en experimentos Biacore (resonancia de plasmones superficiales).

Anticuerpo BiTE®	KD [nM] gp120	Factor*
CD4(1+2)xaCD3	0,71	1
SA21CD4(1+2)xaCD3	4,61	6,5
SA25CD4(1+2)xaCD3	10,3	14,5
Factor* Afinidad de VIH gp120 reducida en comparación con molécula BiTE® parental sin etiqueta ABP		

25 La adición en extremo N-terminal de una etiqueta ABP produce una disminución de 6 a 14 veces en la especificidad de unión cercana (es decir, VIH gp120), véanse Tabla 20 y Figura 8.

Ejemplo 13: Esquema de purificación de anticuerpos BiTE® con un ABP de extremo C-terminal.

Las células de riñón embrionario humano (HEK 293-F, Invitrogen) se transfectaron transitoriamente con 200 µg de un vector pEF DHFR que codifica la secuencia de anticuerpo BiTE® utilizando 293fectin (de acuerdo con el manual del fabricante, Invitrogen). Las células transfectadas se cultivaron en matraces de cultivo celular Erlenmeyer durante 72 horas a 37 °C, 135 rpm, CO₂ al 5 %. De manera alternativa, se cultivaron células CHO de ovario de conejillo de Indias chino transfectadas de manera estable con un vector pEF DHFR que codifica la secuencia de anticuerpo BiTE® en botellas tipo roller hasta alcanzar 60 % de vitalidad restante. Se despejó el sobrenadante de cultivo celular mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos y posterior filtración (0,2 µm) y se aplicó a una columna rellena con un gel quelante cargado con zinc Fractogel EMD Chelate (Merck, Darmstadt) para captura de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).

5

10 Después de cargar la muestra, se lavó el sobrenadante de cultivo celular restante y después de una etapa de pre-elución, los anticuerpos BiTE® etiquetados con HIS6 se eluyeron aplicando un tampón que contiene 500 mM de imidazol.

15 El volumen eluido que contiene los anticuerpos BiTE® se proporcionó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) Superdex S200 (GE Healthcare, Munich) para separar la proteína monomérica BiTE® de la proteína dimérica BiTE® y otras proteínas.

20 Las fracciones que contienen la proteína monomérica BiTE® se agruparon y se determinó la concentración de proteína midiendo absorción óptica a una longitud de onda de 280 nm y longitud de paso de luz de 1 cm y multiplicando por el factor de absorción específico de secuencia de proteína.

25 La purificación ejemplar que muestra el cromatograma SEC del CD4(1+2)xαCD3LxSA21 BiTE® no modificado se muestra en la Figura 9.

30 Las invenciones descritas de manera ilustrativa en la presente memoria pueden llevarse a la práctica de manera apropiada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos de manera específica en el presente documento. De manera adicional, los términos y expresiones empleados en la presente memoria se han utilizado como términos de descripción y no de limitación, y no existe intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se ha de comprender que, si bien la presente invención se ha descrito de manera específica mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificación y variación de las invenciones realizadas y descritas en la presente memoria, y dichas modificaciones y variaciones se consideran comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

40 La invención se ha descrito a grandes rasgos y de manera genérica en el presente documento. Cada una de las subespecies y agrupaciones subgenéricas comprendidas dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que

descarta cualquier tema del género, independientemente de si el material escindido esté o no específicamente descrito en la presente invención.

5 Otras realizaciones están comprendidas dentro las siguientes reivindicaciones. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe, en consecuencia, en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Secuencias

SEQ ID NO.	DESIGNACIÓN	FUENTE	TIPO	SECUENCIA
1	Dominio extracelular de CD3ε humano	humano	Aa	QDGNEMGGITQTTPYKVISISGTTVTLTCTPQYFGSEILWQHNDKNI GGDEDDKNI GSDHLSLKEFSELEQS GYVVCYPRGSKPEDANFYLYLRVCNEMEMD
2	CD3ε humano 1(-27):	humano	Aa	QDGNEMGGITQTTPYKVISISGTTVTLT
3	Dominio extracelular de CD3ε de <i>Callithrix jacchus</i>	<i>Callithrix jacchus</i>	Aa	QDGNEMGDTTQNPYKVISISGTTVTLTCTPRYDGHEIKWLVNSQNKEGHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACL SKE TPAEEAASHYLYLKARVCNCEVEVD
4	CD3ε de <i>Callithrix jacchus</i> 1-27	<i>Callithrix jacchus</i>	aa	QDGNEMGDTTQNPYKVISISGTTVTLT
5	Dominio extracelular de CD3ε de <i>Saguinus oedipus</i>	<i>Saguinus oedipus</i>	aa	QDGNEMGDTTQNPYKVISISGTTVTLTCTPRYDGHEIKWLVNSQNKEGHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACL SKE TPAEEAASHYLYLKARVCNCEVEVD
6	CD3ε de <i>Saguinus oedipus</i> 1-27	<i>Saguinus oedipus</i>	aa	QDGNEMGDTTQNPYKVISISGTTVTLT
7	Dominio extracelular de CD3ε de <i>Saimiri sciureus</i>	<i>Saimiri sciureus</i>	aa	QDGNEEIGDTTQNPYKVISISGTTVTLTCTPRYDQGEIKWLVDQNKEGHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACL SKE TPTEEAASHYLYLKARVCNCEVEVD
8	CD3ε de <i>Saimiri sciureus</i> 1-27	<i>Saimiri sciureus</i>	aa	QDGNEEIGDTTQNPYKVISISGTTVTLT
9	SA04	artificial	aa	DICLPRWGCLW
10	SA04	artificial	nt	GACATCTGCCTGCCTAGATGGGGCTGCCTGTGG

11	SA08	artificial	aa	QGLIGDIDLPRWGCLWGDSVK
12	SA08	artificial	nt	CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACGAC
13	SA21	artificial	aa	RLIEDICLPRWGCLWEDD
14	SA21	artificial	nt	CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACGAC
15	SA25	artificial	aa	EDICLPRWGCLWED
16	SA25	artificial	nt	GAGGACATCTGCC TGCC CAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGAC
17	DX236	artificial	aa	AEGTGDFWFCDRIAWYPQHLCDFDPE
18	DX236	artificial	nt	GCTGAGGGCACCGGGGATTTCTGGTTCTGGACCGGATCGCCTGGTATCCCCAGCACCTGTGGAGTTCTG GACCCCGAA
19	DX321	artificial	aa	AEGTDRNMCKFSWIRSPAFARADPE
20	DX321	artificial	nt	GCTGAGGGCACCGGGACCGGAAACATGTGCAAGTTCAGCTGGATCCGGTCCCCCGCCTTCTGCCCAGAGCC GACCCTGAA
21	AB01	artificial	aa	AASYSDYDVFGGGDFGP
22	AB01	artificial	nt	GCCGCTAGCTACTCCGACTACGACCGTGTTCGGGGAGGACCCGACTTCGGGGCCA
23	AB14	artificial	aa	AARYWDYDVFGGGTPVGG
24	AB14	artificial	nt	GCCGCTCGGTACTGGGACTACGACCGTGTTCGGGGAGGACACCCCGTGGGGGGC
25	AB156	artificial	aa	AARDWDFDVFGGGTPVGG
26	AB156	artificial	nt	GCCGCTCGGGACTGGGACTTCGACGTTTCGGCCGGAGGCACACCCCGTGGGGGGC
27	EpCAM x CD3 x SA21 x etiqueta His	artificial	nt	GAGCTCGTGTGACACAGTCTCCATCCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAGGTCACATGAGCTGCAAG TCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCCAGGGCAG CCTCCTAAACTGTGTACTACTGGCATCCACTAGGGAATCTGGGTCCCTGATCGCTTCCACAGGCAGTGA TCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGAGTGTGAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGAA GATATAGTTATCCGCTACGTTCCGGTGTGGACCAAGCTTGAGATCAAAAGGTGGTGGTCTGGGGGGC GGGGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCGAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGTTCGAGGCTGAGCTGGTAAGGCTGGG

28	EpCAM x CD3 x SA21 x etiqueta His	artificial	aa	<p>ACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGATACCGCTTCACTAACTACTAGCTAGGTTGGTAAAGCAG AGCCTGGACATGGACTGAGTGGATGGAGATATTTCCCTGGAAATGATATCCCTGAAATGATATCCACTACAATGAGAAG TTCAAGGGCAAGCCACACTGACTGCAGACAAAATCTTTCGAGCACAGCCATATATGACAGCTAGTAGCCCTGACA TTTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTCGAAGACTGGAGACTGGAGAGCCATATGACTACTTGGGCCAAA GGACACCGTCACTCTCCCTCCGAGGTTGGTCCGACTGCAACTGTCAGTCCAGTCCAGGGCTGAAGTG AAAAAACCTGGGGCTCAGTGAAGTGTCTTCCAAAGCTTCTGGTACACCTTACTAGGTACACGATGCAC TGGGTAAGGCAAGCACCTGGACAGGCTTGGAAATGGATGGATACATAATTAATCCTAGCCCTGGTTATACTAAT TACGACAGACGCTAAGGCCCGCTCACAACTACACAGACAAAATCCACCACAGCCCTACATGGAACTG AGCAGCTGGCTTCTGAGGACACTGCAACCTATTACTGTGCAAGATATTAATGATGATCATTAATCTGCCCTGAC TACTGGGGCAAGCCACACCGTCACTCTCCAGGCAAGTACTAGTACTGGTCTTGGTGGAAAGTGA GGTTCAAGTGGAGCAGACGACTTACTGACCCAGTCTCCAGCACTCTGTCTGTCTCCAGGGAGCGT GCCACCTGAGCTGCAGAGCCAGTCAAAGTGAAGTTACATGAACCTGTTACAGCAGAAAGCCGGGCAAGGCA CCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCCGTTCACTGGCAGTGGGTCT GGACCGACTACTCTCACAAATCAACAGCTGGAGGCTGAAGATGCTGCCATTAATTAATGCAACAGTGG AGTAGTAACCCGCTCAGTTCGGTGGCGGACCAAGTGGAGATCAAACGGCTGATCGAGGACATCTGCCTG CCCAGATGGGCTGCCCTGTGGAGGACGACCATCATCACCATCATCAT</p>
29	EpCAM x CD3 x SA21	artificial	aa	<p>ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMCKSSQSLNSGNQKNVLTWYQQKFGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSG SGTDFTLTISSVQAEIDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVLRPG TSVKISCKASGYFTNWLGWVKQRPCHGLEWIGDIFPGSGNIHYNKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT FEDSAVYFCARLRNWFDEPMDYWGQTTVTVSSGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFFRYTMH WVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNVADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHYCLD YWGQGTITVSSGEGTSTGSGGGGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPKGA PKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSDYSLIINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKRLIEDICL PRWGCLWEDDHHHHH</p>
29	EpCAM x CD3 x SA21	artificial	aa	<p>ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMCKSSQSLNSGNQKNVLTWYQQKFGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSG SGTDFTLTISSVQAEIDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAELVLRPG TSVKISCKASGYFTNWLGWVKQRPCHGLEWIGDIFPGSGNIHYNKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT FEDSAVYFCARLRNWFDEPMDYWGQTTVTVSSGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFFRYTMH WVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNVADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHYCLD YWGQGTITVSSGEGTSTGSGGGGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPKGA PKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSDYSLIINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKRLIEDICL PRWGCLWEDD</p>

30	CD4(1+2)	artificial	NT	<p>AAGAAAGTGGTGTGGGCAAGAAAGGCGACACCGTGGAACTGACCTGACACCGGCTCCCAAGAAAGTCCATC CAGTCCACTGGAAGAACTCCAACAGATCAAGATCCTGGGCAACAGGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCC TCCAAGCTGAACGACCGGGCCGACTCCAGACGGTCCCTGTGGATCAGGGCAACTTCCCAGTATCATCAAG AACCTGAAGATCGAGGACTCCGACACCTACATCTGCGAGGTGGAAGATCAGAAAGAGGTGCAGCTGCTG GTGTTCGGCCTGACCGCAACAGCACACCCATCTGCTCAGGGCCAGAGCCCTGACCCCTGCAACCTGGAAGC CCCCCTGGCTCCAGCCCTCCGTCAGTCCGCTCCCTCCGGGCAAGAACATCCAGGGGCGCAAGACCCCTG TCCGCTGCCAGCTGGAACTGCAGGACAGCGCACCTGGACCTGTACCTGTCCAGAAACCCAGAAAAAGGTG GAATTCAGATTCGACATCGTGGTGGCTGGCCCTCCAGAAGGCT</p>
31	CD4(1+2)	artificial	AA	<p>KKVVLGKGDVVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILNQGSFLTKGPKLNDRADRRSLMDQNFLLIK NLKIEDSDTYICEVEVDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGSLLTLLLESPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCVTLQNQKVEFKIDIVVIAFQKA</p>
32	CD4(1+2)xaCD3 x etiqueta His	artificial	NT	<p>AAGAAAGTGGTGTGGGCAAGAAAGGCGACACCGTGGAACTGACCTGACACCGGCTCCCAAGAAAGTCCATC CAGTCCACTGGAAGAACTCCAACAGATCAAGATCCTGGGCAACAGGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCC TCCAAGCTGAACGACCGGGCCGACTCCAGACGGTCCCTGTGGATCAGGGCAACTTCCCAGTATCATCAAG AACCTGAAGATCGAGGACTCCGACACCTACATCTGCGAGGTGGAAGATCAGAAAGAGGTGCAGCTGCTG GTGTTCGGCCTGACCGCAACAGCACACCCATCTGCTCAGGGCCAGAGCCCTGACCCCTGCAACCTGGAAGC CCCCCTGGCTCCAGCCCTCCGTCAGTCCGCTCCCTCCGGGCAAGAACATCCAGGGGCGCAAGACCCCTG TCCGCTGCCAGCTGGAACTGCAGGACAGCGCACCTGGACCTGTACCTGTCCAGAAACCCAGAAAAAGGTG GAATTCAGATTCGACATCGTGGTGGCTGGCCCTCCAGAAGGCTCCAGAAAGTCCAGAAACCCAGAAAAAGGTG GTCAGTCTGGAGGAGGATGGTGCAGCCTGGAGGGTCAATGAACTCATGTGCAGCCCTGGATTCACC TTCAAATAAGTACGCCATGAACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGTTTGGATGGTGTCTCGCATAAAGA AGTAAATAATAATTAATGCAACATATTAATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTTACCACTCCAGAGATGAT TCAAAAACACTGCCATACAAATGAACACTTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTACTGTGTGAGA CATGGGAACCTCGGTAATAGTACATATCTACTGGTACTGGGCCAAGGACTTGGTCAACCCGCTCC TCAGGTGGTGGTGTCTGGCCGGCGGGCTCCGGTGGTGGTTCAGACTGTGTGACTCAGGAAACCT TCACTCACCGTATCACCTGGTGAACAGTCACTCACTGTGGCTCCTCGACTGGGGCTGTACATCTGGC AACTACCCAAACTGGTCCAAACAAAAACCAGGTACGGCACCCCTGGTCTAATAGGTGGACTAAGTTCCTC GCCCCCGGTACTCTGCCAGATTCAGGCTCCCTGTGTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCCCTCAGGGGTA CAGCCAGGATGAGGCAAGATATTAATGTGTCTATGGTACAGCAACCCGCTGGGTGTTCGGTGGAGGAAACC AAACTGACTGTCTACATCATCACCATCATCAT</p>

33	CD4(1+2)xaCD3 x etiqueta His	artificial	AA	<p>KKVVLGKGDVVELTCTASQKKSIOFHKNNSQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADRRSLWDQNFFLIIK NLKIEDSDTYICEVEDQKEVQLVFLGLTANSDTHLLOQSLLTLESPGSSVOCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQNKVFEKIDIVLAFQKASGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNVPQAPKGLWVARIRSKYNNYAYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGGGGGGGQTVVTEPESLTVSPGTVTLTCCGSSSTGAVTSG NYENWVQKQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGKKAALTLGCVQPEDEAEYCYVLMYSNRWVFGGTT KLIVLHHHHH</p>
34	CD4 D1,1	artificial	NT	<p>AAGAAAGTCGTGATCGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAACTGACCTGCACCCGCTCCCAGAAAGTCCATC CAGTCCACTGGAAGAACTCCAACAGATCAAGATCCTGGCAACACAGGGCAGCTTCTTGACCAAGGGCCCC TCCAAGCTGAACGACCGGTGGACTTCGGAGATCCCTGTGGATCAGGGCAACTCCCAGTATCAAG AACCTGAAGCCCGAGGACTCCGACACCTACATCTGCGAGTGGAAATCAGAAAAGAGGTCAGCTGATC GTGCTGGGC</p>
35	CD4 D1,1	artificial	AA	<p>KKVVIKKGDTVELTCTASQKKSIOFHKNNSQIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRVDSRRSLWDQNFFLIIK NLKPEDSDTYICEVEDQKEVQLIVLG</p>
36	CD4 D1,1xaCD3 x	artificial	NT	<p>AAGAAAGTCGTGATCGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAACTGACCTGCACCCGCTCCCAGAAAGTCCATC CAGTCCACTGGAAGAACTCCAACAGATCAAGATCCTGGCAACACAGGGCAGCTTCTTGACCAAGGGCCCC</p>
	Etiqueta His			<p>TCCAAGCTGAACGACCGGTGGACTTCGGAGATCCCTGTGGGATCAGGGCAACTTCCCAGTATCATCAAG AACTGAAGCCCGAGGACTCCGACACCTACATCTCGGAGTGGAGATCAGAAAGAGGTGCAGCTGATC GTGCTGGGCTCCGGAGTGGATCCGAGGTGAGTCCAGTGGTCCAGTGGAGGAGATTTGGTGCAGCTGGA GGTCAATGAAACTCTCATGTGCAGCTTCGGATTCACCTCAATAAGTACGCCATGAATGGTCCGCCAG GCTCCAGGAAAGGTTTGAATGGTTCGCATAGAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATGCCC GATCAGTGAAGACAGTTTCAACATCTCCAGAGATGATCAAAAACACATGCTTATCTACAATGAAACAAC TTCAAGACTGAGGACACTGCCGTACTACTGTGAGACTGGAACTTCGGTAATAGTACATATCTTAC TGGGCTTACTGGGGCCAGGGACTTGGTACCCTCTCCAGTGGTGGTGGTCTGGGGCCGGCGCTCC GGTGGTGGTGGTCTTCAGACTTGTGACTCAGAACCTTCACTCACCTATCACCTGGTGAACAGTACACA CTCACTTGTGCTCCTCGACTGGGCTGTTACATCTGGCAACTACCAAACTGGGTCCAAACAAAACAGGT CAGGCAACCGTGGTCTAATAGGTGGACTAAGTTCTCGCCCCCGGTACTCTGCCAGATTTCTCAGGCTCC CTGCTTGGAGCAAGGTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCAGGATGAGGCAGAAATATTACTGTGTT CTATGGTACAGCAACCGCTGGGTGTTCGGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTTACATCATCAACCATCATCAT</p>

41	CD4 D1,2xaCD3 x etiqueta His	artificial	AA	<p>KKVYVKKGDTVELTCTAASQKNIQPHWKNNSQIKILNQGSFLTKGPKSLNDRADSRRLWDQGNFPLIIK NLKPEDSDTYICEVEDQKEEVQLVVGSGGGSEVQLVFSGGGLVQFGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLIKTEPTAVYCYVRHGNFGNSYISY WAYWQGTIVTVSSGGSGGGSSGGSSQVTVTQEPSTLVSPGGVTVLTCGSSGTGAVTSGNYPNWVQKPG QAPRGLIGGTRKFLAPGTPARFSGSLIGGKAALTLISGVQPEDEAEYYCVLWYSNRPWFVGGGKLTVLHHHHH</p>
42	SA21CD4(1+2)	artificial	NT	<p>CGGCTGATCGAGGACATCTGCCTGCCTAGATGGGCTGCCCTGGGAGGACGACAAAGAAAGTGGTGTGGGC AAGAAAGGGACACCCGTGGAACCTGACCTGCACCCGCTCCAGAAAGAAAGTCCATCCAGTTCCTCCAGTGGAGAAC TCCAAACAGATCAAGATCCTGGGCAACCAGGGCAGCTTCCCTGACCACAGGGCCCTCCAAAGTGAACGACCCGG GCCGACTCTCGAGATCCTGTGGGATCAGGGCAACTTCCCACTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGAT TCCGACACCTACATCTGGAGGTGGAAGATCAGAAAGAGAGGTGCTGCTGTTGGCTGACCCGC AATCCGATACCCATCTGCTGCAGGGCAGTCCCTGACCTGACACTGGAATCTCCACCCGGCTCCAGCCCT TCCGTGCAGTGCAGATCTCCAGAGGCAAGAACATCCAGGGGGCAAGACCCCTGCTCCGTGTCCAGCTGGAA CTGCAGGACTCTGGCACCTGGACCTGTACCGTGCTGAGAACAGGAAAGGTTGGAATTCAGATCGACATC GTGGTGTGGCCTTCCAGAGGCC</p>
43	SA21CD4(1+2)	artificial	AA	<p>RLIEDICLPRWGLWEDDKKVVIGKKGDTVELLCTASQKKSQFHWKNSNQIKILNQGSFLTKGPKSLNDR ADSRRLWDQGNFPLIIRKLNKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLVFGLTANSDTHLQGSILTLTLESPPGSSP SVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLELQDSGTWCTVTLQNKVFEFKIDIVVLAFAQ</p>

44	SA21CD4(1+2)x etiqueta His	aCD3 x artificial	NT	<p>CGGCTGATCGAGGACATCTGCCCTGCTAGATGGGGCTGCCCTGGGAGCAGACAGAAAGTGGTGGTGGGC AAGAAAGGCGACACCGTGGAACTGACTGCACCGCTCCAGAAAGAAAGTCCATCCAGTCCACTGGAAAGAAC TCCAAACAGATCAAGATCTTGGGCAACCCAGGGAGCTTCCCTGACCACAGGCCCTCCAAAGCTGAACGACCCGG GCCGACTCTCGAGATCCCTGTGGGATCAGGGCAACTTCCGACTGATCATCAAGAACTGAAGATCGAGGAT TCCGACACTACATCGGAGGTGGAAGATCAGAAAGAGGTGCGTGTGGTGTCCGCTGACCCGC AATCCGATACCCATCTGGTGCAGGGCAGTCCCTGACCTGACACTGGAACTCCACCCGGTCCAGCCCT TCCGTGAGTCCAGATCTCCAGAGCAAGACATCCAGGGCGCAAGACCTTCCGCTGCCAGCTGGAA CTGCAGACTCTGGACCTGGACCTTACCGTGTGAGAACAGAAAGGTGGAATCAAGATCGACATC GTGGTGTGGCTTCCAGAAAGCCCTCCGAGGTGGTGAATCCGAGGTGCGAGCTGGTCTGGAGTCTGGAGGAGA TTGGTGCAGCTGGAGGTCATGAAACTCTCATGTGCAGCTCTGGATCACTCAATAAGTACGCCATG AACTGGTCCGCCAGGCTCCAGAAAGGGTTTGGAAATGGTGTCTCGATAGAAATGAAATATAATAATAT GCAACATATTATGCCGATCAGTGAAGACAGGTTCACTCCAGATGATCAAAAAACACTGCCCTAT CTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGACTACTGTGAGACATGGAACTTCGGTAAAT AGCTACATACTTACTGGCTTACTGGGCCAAGGGACTGTGGTCACTCCCTCAGGTGGTGGTGTCT GGCGGGGGCTCCGGTGGTGGTCTCAGACTGTGTGACTCAGAACCTTCACTCACCCTATCACCCT GGTGAACAGTACACTCACTTGTGGTCTCTCGACTGGGCTGTACATCTGGCACTACCCAAACTGGGTC CAACAAAAACAGGTCAGGCACCCCGTGGTCTAATAGGTGGACTAAGTCTCCGCCCGGACTCCTGCC AGATCTCAGGCTCCCTGGTGGAGCAAGGCTGCCCTCACCCTCAGGGGTACAGCCAGGATGAGGCA GAATAATTACTGTCTATGGTACAGCAACCCGCTGGTGTCTGGTGGAGAAACCAACTGACTGTCTCTACAT CATCACCATCATCAT</p>
45	SA21CD4(1+2)x etiqueta His	aCD3 x artificial	AA	<p>RLIEDICLPRWGLWEDDKVVLGKGDVTELTCTASQKKSIOFHWNNSQIKILGNQGSFLTKGPKLNDR ADRRSLWDQGNFPLIIKMLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLQGSLSLTLLESPPGSSP SVQCRSPRGKNIQGGKTLVSVQLELQDSGTWICTVLQNKVFEFKIDIVLAFQKASGGGSEVQLVESGGG LVQPGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNLIKTEDAVYYCVRHNGFNYSYISWAYWQGTLVVYSSGGGSGGGSSQTVVTVQEPSLITVSP GGTVTLTCGSSGTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTRFLAPGTPARFSGSLIGGKKAALTLVSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRPVFGGKTLTVLHHHHH</p>

46	SA25CD4(1+2)	artificial	NT	<p>GAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCCTGGGAGGACAAAGTGGTCTGGGCAAGAAAAGGGGAC ACCGTGGAAGTGAACCTGACCCGCTCCAGAAAGTCCATCCAGTCCACTGGAAGAACTCCAACCCAGATC AAGATCCTGGGCAACCAGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCTCCAGCTGAACGACCGGGCCGACTCTCGG AGATCCCTGTGGGATCAGGGCAACTTCCCACTGATCATCAAGAACCCTGAAGATCGAGGACTCCGACACCTAC ATCTGCGAGGTGGAAGATCAGAAAGAAGAGGTGAGTGTGGTGTGGCCGACCCGCAACACGCGACACCC CATCTGCTGAGGGCCACTCCCTGACCTGACATGGAATCTCCACCCTGCTCCAGCCCTCCAGCTGCGACTGC AGATCTCCCAGAGGCAAGAACATCCAGGGGGCAAGACCTGTCCGCTCCCACTGGAATCGAGACTCGAGACTCT GGCACCTGGACCTGTACCGTGTGCAGAACCCAGAAAAAGGTGGAATCAAGATCGACATCGTGGTGTGGCC TTCCAGAGGGCC</p>
47	SA25CD4(1+2)	artificial	AA	<p>EDICLPRWGLMEDKVVIGKKGDTVELTCTASQKKSIIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKINDRADSR RSLWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFLGTANSDTHLLOQSLTLTLESPPGSSPSVQC RSPRGKNIQGGKTLVSVQLELQDSGTWTCVTLQNKVVEFKIDIVVLAFAQ</p>
48	SA25CD4(1+2)x etiqueta His	artificial	NT	<p>GAGGACATCTGCCTGCCAGATGGGGCTGCCCTGGGAGGACAAAGTGGTGGTGGGCAAGAAAAGGGGAC ACCGTGGAAGTGAACCTGACCCGCTCCAGAAAGTCCATCCAGTCCACTGGAAGAACTCCAACCCAGATC AAGATCCTGGGCAACCAGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCTCCAAGCTGAACGACCGGGCCGACTCTCGG AGATCCCTGTGGGATCAGGGCAACTTCCCACTGATCATCAAGAACCCTGAAGATCGAGGACTCCGACACCTAC ATCTGCGAGGTGGAAGATCAGAAAGAAGAGGTGAGTGTGGTGTGGCCGACCCGCAACAGCGACACCC CATCTGCTGAGGGCCACTCCCTGACCTGAAATCTCCACCCTGCTCCAGCCCTCCAGCTGCGACTGCAGTGC AGATCTCCCAGAGGCAAGAACATCCAGGGGGCAAGACCCCTGTCCGCTCCCACTGGAATCGAGGACTCT GGCACCTGGACCTGTACCGTGTGCAGAACCCAGAAAAAGGTGGAATCAAGATCGACATCGTGGTGTGGCC TTCAGAGAGGCTCCGGAGTGGTGGATCCGAGTCCGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG GGAGGTCAATGAAACTCTCATGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAATAAGTACGCCATGAACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGAAAGGTTGGAATGGTTCGCGCATAGAAGTAAATATAATATATGCAACATATAT GCGGATTCAGTGAAGAGCAGGTTACCATCTCCAGAGATGATCAAAAAACACTGCCATCFACAAATGAAC AACTTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTACTGTGTGAGACATGGGAACTTCGGTAATAGCTACATATCC TACTGGGCTTACTGGGCAAGGACTTGGTCAACCCTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGC TCCGTTGG ACACTCACTTGTGGTCCCTGACTGGGCTGTACATCTGGCAACTACCCAACTGGGTCCCAAAAAACA GGTGAGGCACCCCGTGGTCTAATAGGTGGGACTAAGTTCCTCCCGCCCGGTACTCTGCCAGATCTCAGGC TCCCTGCTTGAGGGCAAGCTGCCCTCACCTCTCAGGGTACAGCCAGAGGATGAGGCAGATATATTACTGT GTTCTATGGTACAGCAACCGCTGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT CAT</p>

49	SA25CD4(1+2)x etiqueta His	aCD3 x	artificial	AA	<p>EDICLPRWGLWEDKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIOFHWKNSNOIKILGNQGSFLTTPKPSKLNDRADSR RSLWDOGNFPILIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGSLLTLLTLESPPGSSPSVQC RSRFGKNIQGGKTLVSVQLELQDSGTWTCTVLOKQKVEFKIDIVLAFQKASGGGSEVQLVESGGGLVQF GGSLLKSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNIATYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGFNSYI SYWAYWGQTLVTVSSGGGGGGGSSQTVVTVQESLTVSPGGTV TLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAALTLVSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGKTLIVLHHHHH</p>
50	CD4(1+2)xaCD3 etiqueta His	SA21 x	artificial	NT	<p>AAGAAAGTGGTCTGGGCAAGAAAGGCGACACCGTGGAACTGACCTGGACCCGCTCCAGAAAGATCCATC CAGTCCACTGGAAGAAGTCCAAACCAGATCAAGATCCTGGCAACCAGGGCAGCTTCCTGACCAAGGGCCCC TCCAAAGCTGAAGACCGGGCCGACTCCAGACGGTCCCTGTGGATCAGGCAACTCCCAGTCAATCAAG AACCTGAAGATCAGGACTCCGACACTACATCTCGAGGTGGAAGATCAGAAAAGAGGTCAGCTGCTG GTGTCCGCTGACCCGCAACAGCGACACCCATCTGTGAGGGCCAGCCCTGACCTGAAAGC CCCCCTGGCTCCAGCCCTTCGTGAGTCCGGTCCCTCCGGGCAAGAAATCCAGGGGGCAAGACCCCTG TCCGTGCCAGCTGAACTGCAGACAGCGGACCTGGACTGTACCGTGTCCAGAACCAAGAAAGGTG GAATCAAGATCGACATCGTGGTGGCTTCCAGAAAGGCTCCGGAGTGGTGGATCCGAGTGCAGCTG GTCAGTCTGAGGAGGATGGTGCAGCCCTGGAGGTCATTGAACTCAATGTGCAGCCTCTGGATTACCC TTCAAATAGTACGCCATGAAC TGGTCCGCCAGCTCCAGAAAGGTTTGGAAATGGTTCGCATAGA AGTAAATATAATAATATGCAACATATATGCCGATTCAGTGAAGAGAGGTTCCACATCTCCAGAGATGAT TCAAAAACACTGCCCTATCACAAATCAACAACTTGAAGACTGAGGACACTGCCGTACTACTGTGTGAGA CATGGAACTTCGGTAAAGTACATATCCTACTGGGCTACTGGGGCAAGGACTCTGGTCAACCGTCTCC TCAGTGGTGGTGTCTGGCGGGGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCACAGACTGTGTGACTCAGGAACT TCACTACCGTATCACCTGGTGAACAGTCACTCACTTGTGGCTCCCTCGACTGGGGCTGTACATCTGGC AACTACCAACTGGTCCAAACAAACAGGTCAGGACCCCGTGGTCTAATAGTGGGACTAAGTTCCTC GCCCCGGTACTGCCAGATTCAGGCTCCCTGTGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCAGGGGTA CAGCCAGAGGATGAGGAGAAATTAATGTGTCTATGTTACAGCAACCGCTGGGTTCGGTGGAGGAACC AACTGACTGCTACGGCTGATTGAAGATATTTGCCCTGCCGCGCTGGGGCTGCCCTGTGGAAAGATGATCAT CATCACCATCATCAT</p>
51	CD4(1+2)xaCD3 etiqueta His	SA21 x	artificial	AA	<p>KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIOFHWKNSNOIKILGNQGSFLTTPKPSKLNDRADSRRLWDOGNFPILIIK NLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGSLLTLLTLESPPGSSPSVQCRSPRKNIOGGKTL SVSLELQDSGTWTCTVLOKQKVEFKIDIVLAFQKASGGGSEVQLVESGGGLVQFPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNIATYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVR HGNFNSYI SYWAYWGQTLVTVSSGGGGGGGSSQTVVTVQESLTVSPGGTVVTVQESLTVSPGGTVVTVQESLTVSPGGTV NYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAALTLVSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGCT KLTVLRLLIEDICLPRWGLWEDDDHHHHH</p>

52	CD4 (1) xaCD3 SA21	artificial	AA	<p>KKVYLGGKGDVVELTCTASOKKSIQFHWKNSQIKILGNQGSFLTKKFSKLNDRADSRRLWDOGNFLLIHK NLKIEDSDTYICEVEDQKEVEVQLLVFLGTANSDPHLLQGSLLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGNKIQQGKTL SVSQLEIQDSGTWCTVILQNKQKVEFKIDIVLAFQKASGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAAGFT FNKYAMNWVRQAPGKGLWVARIKRSYNNIATYADSVKDFDTISRDSKNTAYLQMNLLKPTEDTAVYVCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVVSSGGGGGGGGGSGQPVVTVQEPSTLTVSPGGTIVTLTCSGSTGAVTSG NYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLIGKFAALTLSTVQPEDEAFYCYLWYSNRWVTFGGGT KLVYLRLLIEDICLPRWGCLWEDD</p>
53	CD4(1+2)xaCD3 LSA21 x etiqueta His	artificial	NT	<p>AAAGAAAGTGGTGGTGGGZAAGAAAGCGGACACCGTGGAACTGACCTGGACCCGCTCCAGAAAGATCCATC CAGTCCACTGGAAGAACTCCAACAGATCAAGATCCTGGCAACACAGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCC TCCAAGCTGAAGACCGGGCCGACTCCAGACGGTCCCTGTGGGATCAGGCCAACTTCCCCTGATCATCAAG AACTGAAGATCGAGGACTCCGACACTACATCTCGAGGTGGAAGATCAGAAAGAAAGAGGTGCAGCTGGCTG GTGTTCCGGCTGACCCCAACAGCCACCCATCTGTGAGGGCCAGAGCCTGACCTGACCTGGAAAGC CCCCTGGCTCCAGCCCTTCGGTGAAGTCCCGTCCCTCGGGGCAAGAAATCCAGGGGGCAAGACCCTG TCCGTGCCAGCTGGAATGCAGGACAGCGGACCTGGACTGTACCGTGTCCAGAACCCAGAAAAGGTTG GAATTCAGATCGACATCGTGGTGGCTTCCAGAAAGGCTCCGGAGCGGAGGATCTGAAGTGCAGCTG GTGAAATCTGGGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTGAAGCTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCAAC TTCACAAATACGCCATGAACGGGTGGACAGGCCCTTGGCAAGGGCTGGAATGGTGGCCCGGATCAGA TCCAAGTACAAACIACCTACCTACTACCGGACTCCGTGAAGGACCGGTTACCATCTCCCGGGACGAC TCCAAGAACCCGCTACTGCAGATGAACAACCTGAAACCGAGGACACCCCGTGTACTGCGGTGGCGG CACGGCACTTCGGCACTCTACATCAGCTACTGGCCCTACTGGGCCAGGGCCCTCGTGACAGTGTCA TCAGGTGGCGGTGATCTGGGGGAGGGGTTACAGCGGGAGGGGATCTCAGACAGTCTGACCCAGGAACCC TCCCTGACCCGTCTCCTGGCGGAACCGTGAACCTGACCTGGGATCTTCTACCGGCGCTGACCTCCGGC AACTACCCTAATGGGTGCAGAGAAGCCCGGCAGGCTCCAGAGGACTGATCGSGGGCACCAGTTTCTG GCTCCCGCACCCCTGCCAGATTCCCGGTTCTGTGGGGGCAAGCCCGCTGACTCTGTCTGTGGGTG CAGCCAGAGGACGAGCCGAGTACTAFTGT AAGCTGACAGTCTGGGTGGCGGAGGCTCTCGGCTGATCGAGGACATCTGCCCTGCCCTAGATGGGGCTGCCCTG TGGGAGGACGACCAACCACCATCACCAC</p>

54	CD4(1+2)xaCD3 etiqueta His	LSA21 x	artificial	AA	<p>KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHKMNSQIKILGNQGSFLTKGFSKLNDRADSRRLWDQGNFFLLIK NLKIEDSDTYICEVEDEQKEVQLLVFGLTANSDTHLLOGQSLTLTLESPGSSPVQCRSPRKNIOGGRTL SVSQLELQDSCTWCTVLQNKKEFKIDIVVLAFOKASGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCCSSTGAVTSG NYPNWQQKPGQAPRGLIGGTKFLAFTPARFSGSLGGKAAALTLGGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGDT KLTIVLGGGGSRLLIEDICLPRWGCLWEDDHHHHH</p>
55	CD4 (1) xaCD3 LSA21		artificial	AA	<p>KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHKMNSQIKILGNQGSFLTKGFSKLNDRADSRRLWDQGNFFLLIK NLKIEDSDTYICEVEDEQKEVQLLVFGLTANSDTHLLOGQSLTLTLESPGSSPVQCRSPRKNIOGGRTL SVSQLELQDSCTWCTVLQNKKEFKIDIVVLAFOKASGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCCSSTGAVTSG NYPNWQQKPGQAPRGLIGGTKFLAFTPARFSGSLGGKAAALTLGGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGDT KLTIVLGGGGSRLLIEDICLPRWGCLWEDD</p>
56	CD4(1+2)xaCD3 His	LxSA21 x	artificial	NT	<p>AAAGAAAGTGGTCTGGGAAGAAAGCCGACCCGTGGAACTGACCTGCACCCCTCCCAAGAAAGTCCATC CAGTCCACTGGAAGAACTCCAACCAAGATCAAGATCCTGGCAACCAAGGCGAGCTCCTGACCAAGGGCCCC TCCAAGCTGAACGACCCGGCCGACTCCAGACGGTCCCTGTGGGATCAGGGCAACTCCCCTGATCATCAAG</p>

	etiqueta			<p>AACTGAAGATCGAGGACTCCGACACCTACATCTCGAGGTGGAAGATCAGAAAAGAGGTCGAGCTGGCTG GTGTTGGCTGACCCGCAACAGCGACACCCATCTGTGAGGGCCAGACCTGACCTGACCTGGAAGC CCCCCTGGCTCCAGCCCTCCGTTGAGTCCCGTCCCTCGGGGCAAGAACATCCAGGGCGGCAAGACCCCTG TCCGTGCCAGCTGGAATGCAGGACAGGCAACCTGGACTGTACCGTGTGAGAACACCAAGAAAGGTTG GAATCAAGATCGACATCGTGTGCTCCAGAAAGGTCGAGAGGTCGAGGGGAGGATCTGAGTGCAGTGTG GTGAAATCGGGCGGACTGGTGCAGCTCCGCGGATCTTGAAGCTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCAAC TTCAACAAATACGCCATGAATGGTGGGACAGGCCCCCTGGCAAGGCTGGAAUAGGTTGGTGGCCCGGATCAGA TCCAAGTACAAACACTACCTACTACCGGACTCCGTAAGGACCGGTTCCACATCTCCCGGACGAC TCCAAGAACCCGCTACTGCAGATGAACACTGAAACCCAGGACACCCCGTGTACTACTGCGGTGCGG CACGGCAACTTCGGCAACTCTACATCAGCTACTGGGCTACTGGGGCCAGGCAACCTCGTGACAGTGTCA TCAGGTGGCGTGAICTGGGGGAGCGGTTCCAGCGGAGGGGATCTCAGACAGTGTGACCCAGGAACCC TCCCTGACCCGTCTCTCGCGGACCGTACCTGACCTGACCTGGGATCTTACCAGGCTGTGACCTCCGCG AACTACCCATAATGGTGCAGACAGACCCCGGACGCTCCAGAGGACTGATCGGCGGCAACCAAGTTTCTG GCTCCCGCACCCCTGCCAGATTCCCGTCTCTGCTGGCGGCAAGCGCTGACTCTGCTGGGTG CAGCAGAGGACGAGCCGAGTACTATTGTGCTGTGGTACTCAACCGCTGGTGTCCGCGGAGGCAAC AAGCTGACAGTCTGGTGGCGGAGGTTCTGGCGGGGAGGCACTGGGGGGGAGGATCTAGACTGATCGAG GACATCTGCCCTGCCAGATGGGGCTGCCTGTGGGAGGACGATCACCCACCCATCACAC</p>
57	CD4(1+2)xaCD3 LxSA21 x etiqueta His	artificial	AA	<p>KKVVLGKGDVVELTCTASOKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTITKFSKLNDRADRRSLWDQGNFPLIHK NLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGSLTLTLESPGSSPSVQCRSPRKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWCTVLQNKVVEFKIDIVLAFQKASGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVROAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSG NYPNWVQKPKQAPRGLIGTKFLAFTPARFSGSLLGKRAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGDT KLVTLGGGGGGGGGGSRLLIEDICLPRWGCLWEDDDHHHHH</p>
58	CD4 (1) xaCD3 LxSA21	artificial	AA	<p>KKVVLGKGDVVELTCTASOKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTITKFSKLNDRADRRSLWDQGNFPLIHK NLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGSLTLTLESPGSSPSVQCRSPRKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWCTVLQNKVVEFKIDIVLAFQKASGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVROAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSG NYPNWVQKPKQAPRGLIGTKFLAFTPARFSGSLLGKRAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGDT KLVTLGGGGGGGGGGSRLLIEDICLPRWGCLWEDD</p>

61	CD4 (1) xaCD3 SA25	artificial	AA	<p>KKVVLGKKGDTVELLCTAASQKKSIOFHWNKSQIKILGNQGSFLTKGFSKLNDRADRRSLWQGNFPLLIK NLKIEDSDTYICEVEDOKBEVQLLVFLTANSTHLLQGSLLTLLESPGSSPVQCRSPRKNIOGGFTL SVSOLELQDSTWTCVILQNKKEFKIDIVVLAFAKASGGGSEVQLVESGGGLVFPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWRQAPKGLWEVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDSKNATAYLQMNLNKTEDTAVIYCVR HGNFGNSYISYWAYMGQGTIVTVSSGGGGGGGSSQTVVTVQEPSLTVSPGTVTLTCSGSSTGAVTSG NYPNWQQKPGQAPRGLIGGTFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGVSQVPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGDT KLIVLEIDICLPRWGCLWED</p>
62	SA21 LCD4(1+2)xaCD3 x etiqueta His	artificial	NT	<p>CGGGTGATCGAGGACATGTGCCCTGCTAGATGGGGCTGCCCTGTGGGAGGATGATGGCGGGGAGGCTCCRAAG AAAGTGGTGTGGGCAAGAAAGGCGACACCCGTGGAACGTGACCTGCACCGCTCCAGAAAGAAAGTCCATCCAG TTCACCTGGAAAGAACTCCAAACAGATCAAGATCCTGGGCAACAGGCGACTTCCGTACCAAGGGCCCCCTCC AAGTGAACGACCGGGCGACTCTCGAGATCCCTGTGGATCAGGGCAACTTCCCACCTGATCAAGAAC CTGAAGATCGAGGATTCGACACCTACATCTGGAGGTGGAGATCAGAAAGAGAGGTGCAGCTGTGGTG TTCGGCTGACCGCCAACTCCGATACCCATCTGCTGACGGCCAGTCCCTGACCTGACACTGAAATCTCCA CCCCCTCCAGCCCTTCCGTGCAGTGCAGATCTCCAGAGCAAGAACTCCAGGGCGGCAAGACCCCTGTCC GTGTCCAGCTGGAACCTGCAGGACTCTGGCACCTGGACCTGTACCCTGTGCAGAACCCAGAAAAGGTGGAA TTCAGATCGACATCGTGTGCTGGCTTCCAGAAAGGCTCCGGAGGTGGTCCGAGGTCAGCTGGATCCACTC GAGTCTGGAGGAGGATTTGGTGCAGCTGGAGGTGATTTGAACTCTCATGTGCAGCTCTGGATTCACCTTC AATAAGTACGGCATGAACCTGGTCCGAGGCTCCAGGAAAGGTTTGGAAATGGTGTCTCGGATAAGAAAGT AAATATAATAATATGCAACATAATATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTTCCACTCCAGAGATGATTC AAAAACACTGCCATCTACAAAATGAACAACTTGAAGACTGAGGACACTGCCGTTACTACTGTGTGAGACAT</p>
				<p>GGGAACCTCGGTAATAGCTACATACTCTACTGGGCTTACTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACCGTCTCCTCA GGTGGTGGTGGTCTGGGGGGGGGCTCCGGTGGTGGTCTCAGACTGTTCTGACTCAGAAACCTTCA CTCACCGTATCACCTGGTGAACAGTCACTACTTGTGGCTCCTCCACTGGGCTGTTACTACTGGCAAC TACCCAACTGGTCCAAACAAAACAGGTCAGCACCCCTGGTCTAATAGGTGGGACTAAGTTCCTCCGCC CCCCGTACTCCTGCCAGATCTCAGGCTCCCTGTGGAGCAAGGCTCCCTCACCTCTCAGGGGTACAG CCAGAGGATGAGGCAGATAATTAATGTTCTATGTTACAGCAACCCGCTGGTGTCTGGTGGAGAACCCAAA CTGACTGTCTTACATCATCACCATCATCAI</p>

63	SA21 LCD4(1+2)xaCD3 etiqueta His	artificial	AA	<p>RLIEDICLPRWGLWEDDGGGSKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSQIKILGQGSFLTITKGPS KLNDRADSRRLWDQGNFPLI IKNLIKIEDSDTYICEVEDQKEVQLLVFLGTANSHTLLQGSLLTLTLESF PGGSPVQCRSPRGNIOGKKTLSVQLELQDSTWTCTVLQNKKEFKIDIVVLAFAKASCGGGSEVQIV ESGGLVQPGSLKLSRAASGFTFNKYAMNVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDSDS KNTAYLQMNMLKTEDTAVYCVRHGNGFNYSI SYWAYWGQZLVTVSSGGGGGGGGGQTVVTQPPS LTVSPGQTVTLTCGSSQAVTSGNYPNWVQKPKQAPRGLIGGKTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALLTSLGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLVLIHHHHH</p>
64	SA21 LxCD4(1+ 2)xaCD3 x etiqueta His	artificial	NT	<p>CGGCTGATCGAGGACATCTGCCCTAGATGGGGCTGCCCTGGGAGGATGATGGCGGGGAGGATCTGGC GGAGGTGGAAGCGGGGGGATCAAAAAGTGGTGGGCAAGAAAAGGCGACACCGTGGAACTGGACC TGCACCCCTCCAGAGAAGTCCATCCAGTTCACCTGGAAAGACTCCAAACAGATCAAGATCCTGGGCAAC CAGGACAGCTTCCGACCAAGGGCCCTCCAAGTGAACGACCGGGCGACTCTCGGAGATCCCTGTGGGAT CAGGCAACTTCCCACATCAAGAACCIGAAGATCGAGGATTCGACACCTACATCTGGAACTGGAA GATCAGAAAGAGAGGTGAGCTGTGTGTTCGGCCCTGACCGCAACTCCGATACCCATCTGCTGCAGGGC CAGTCCCTGACCTGAAATCTCACCCGGCTCCAGCCCTCCGTCAGTCCAGATCTCCAGAGGC AAGAACATCCAGGGCGCAAGACCCTGTCGGTCCAGCTGGAACCTGCAGGACTTGGCACCCTGGACCCTGT ACCGTGCTGCAAAACCAAAAAGTGAATTCAAATCGACATCGTGTGCTGGCCCTCCAGAAAGCCCTCC GGAGTGTGGATCCGAGGTGACGTGGTGGTCTGGAGGAGGATTTGGTGCAGCCCTGGAGGTCATTTGAAA CTCTCATGTGCAAGCCCTGGATTCACCTTCAATAAGTACGCCATGAACTGGTCCCGCAGGCTCCAGGAAAG GGTTGGAAATGGTTCGCATAGAAGTAAATATAATAATGCAACATAATATGCCGATTCAGTGAAG GACAGGTTCAACATCTCCAGAGATGATCAAAAACACTGCTCTATCTACAAATGAACTTGAAGACTGAG GACACTGCCGTACTACTGTGTGAGACATGGAACTTCGGTAATAGTACATATCTACTGGCTTACTGG GGCCAAAGGACTCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGTCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGT TCTCAGACTGTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCCGTATCACCTGGTGGAAACAGTACACTTGTGGC TCCTCGACTGGGGCTGTACATCTGGCAACTACCCAAACTGGGTCCAAACAAAACAGGTACGACCCCGT GGTCATAAGGTGGACTAAGTTCCTCGCCCGGTACTCTGCCAGATTCCTCAGGCTCCCTGCTTGTATGGTACAGC AAGGCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCAGAGGATGAGGCAGAAATATTAAGTCTTCTATGGTACAGC AACCGCTGGGTGTTCCGTTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTCTACATCACTACCATCATCATCATCAT</p>
65	SA21 LxCD4(1+ 2)xaCD3 x etiqueta His	artificial	AA	<p>RLIEDICLPRWGLWEDDGGGSGGGGSKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSQIKILGN QCSFLTITKPKLNDRADSRRLWDQGNFPLI IKNLIKIEDSDTYICEVEDQKEVQLLVFLGTANSHTLLQ QSLTLTLESPPGSSPVSQCRSPRGNIOGKKTLSVQLELQDSTWTCTVLQNKKEFKIDIVVLAFAKAS GGGSEVQLVBSGGGLVQPGSLLKLSRAASGFTFNKYAMNVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTI SRDSDSKNTAYLQMNMLKTEDTAVYCVRHGNGFNYSI SYWAYWGQZLVTVSSGGGGGGGGG</p>

<p>66</p>	<p>CD4(1+2)SA21x etiqueta His</p>	<p>aCD3 x</p>	<p>artificial</p>	<p>NT</p>	<p>SQVTVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLIGG KAALTLSCVQPEDEAEYCYCVLWYSNRWFVGGTKLTVLHHHHH</p> <p>AAGAAAGTGGTCTGGCAAGAAAGGCGACACCGTGAACCTGAACTGACCTGCACCCGACCCAGCAAGAAAGTCCATC CAGTTCACCTGGAAGAACAGCAACACAGATCAAGATCTGGCAACACAGGCAGCTTCCTGACCAAGGGCCCC AGCAAGCTGAACAGACAGACCGGACTCTCGGGAGCTGTGGGACCCAGGCAATTTCCCACTGATCATCAAG AACCTGAAGATCGAGGACGACGACCTACATCTCGAGTGGAGATCAAGAAAGAGGTGAGCTGCTGAG GTGTTCCGCTGACCCCAACTCCGACACCTATCTGTGAGGGCCAGAGCCTGACCTGACACTGGAAGC CCTCAGGCACAGCCCGCTGCACTGTAGAGCCCAAGGCAAGCAATCCAGGGCCGCAAGACCCCTG AGGCTGCCAGCTGAACTGAGGATAGCGGACCTGGACCTGTACCGTGTGAGAAACCCAGAAAAGGTG GAGTCAAGATCGACA TCGTGGTGTGGCTTCCAGAAAGCCCGGTGATCGAGGATATCTGCCTGCCCA TGGGCTGTCTGTGGGAGACGACGAGTGCAGTGGTGGAACTTGGCCGGGACTGGTGCAGCCTGGCCG TCTCTGAAGCTGAGCTGTCCCGCCAGCGCTTCACTTCAACAAATAGCCATGACTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGCAAAGCCCTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAATA TGCCACCTACTACGCCGAC AGCGTGAAGGACCGTTTCAACATCAGCAGGACGACTCCAGAAACACCCGCTACCTGCAGATGAACAACCTG AAAACCGAGGATACCGCGTGTACTTACTGCGTGGGCAACCGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTACTGG GCCTACTGGGCGCAGGCAACTCGTGACAGTGTAGCGGAGCGGAGGATCAGCGGGGAGAGAGTGGC GGAGGGGATCTCAGACAGTGTGACCCAGGACCCAGCCTGACCGTCTCTCCCTGGCGGAACCGTGACACTG ACATGCGGCAAGCTTACAGCGCCGCTGACCGGCAACTACCTAATGGGTGAGCAGCAAGCCCGGACAG GCCCAAGAGACTGATCGCGCGCAACAAAGTTTCTGGCTCCCGGCAACCTGACCTGACCTGACCTGACCTG CTGGAGGAAAGCCCGCTGACTGTCTGGGTGACGCAAGGATGAGGCCGAGTACTATGTGTGCTG TGGTACAGCAACCCGCTGGTGTTCGGAGCGGCAAAAGCTGACAGTGTGACAGTGTGACCAACCACTACCCAC</p>
<p>67</p>	<p>CD4(1+2)SA21x etiqueta His</p>	<p>aCD3 x</p>	<p>artificial</p>	<p>AA</p>	<p>KKVYLGKGDVTELTCTASOKKSIQFHWKNSNQIKILNGQSFLLTRKPSKLNPRADSRRLMDQGNFLLIK NLKIEDSDTYICEVEDEQKEVQLLVFGLTANSDTHLLQ9SLTLLLESPPGSSFSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELDSDSTWTCTVLQNKVFEFKIDIVLAFQKARLIEDICLPRWGLWEDDEVQVLESVGGGLVQPGG SLKLSCAAAGFTFNKYAMNWRQAPKGLWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNIL KTEDTAVYYCYVRHGNFNSYISYWAYWGQGLLVTVSSGGGGGGGGSSQTVVTVQEPSTLVSPGGTVTL TCGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLIGGKAAITLSCVQPEDEAEYCYCVL WYSNRWFVGGTKLTVLHHHHH</p>

68	CD4(1+2)LSA21 etiqueta His	LxaCD3 x	artificial	NT	<p> AAATAAGTGGTGTGGGCAAGAAAGGCGACACCGTGGAACTGACCTGACCCGACCCAGCAAGAAAGTCCATC CAGTCCACHTGGAAAGAACAGCAACAGATCAAGATCCTGGGCAACAGGGCAGCTTCTTGACCAAGGCCCC AGAAAGCTGAACGACAGAGCCGACTCTCGGGGAGCCTGTGGACAGGGCAATTTCCCACTGATCATCAAG AACCTAAGATCGAGGACGACACCTACACTGCGAGTGGAAAGATCAGAAAGAGGTCACCTGCTG GTGTGGCCGTGACCGCAACTCCGACACCCACTGCTGAGGGCCAGAGCCTGACCTGACACTGGAAGC CCTCCAGGACAGCCCCAGCTGTGAGTGTAGAAAGCCGACAGGGCAAGAAATCCAGGGGGCAAGACCCTG AGCGTGTCCAGCTGGAACTGCAGGATAGCGGCACCTGGACCTGTACCGTGGCTCAGAACAGAAAAGGTG GAGTCAAGATGACATCGTGTGGTGGCTTCCGAAAGCCGGGAGGCGCTTAGACTGATCGAGGAT ATCTGCCTGCCAGATGGGCTGTGTGGAGGACGATTCGGAGGTGGTGTCCGAGGTGCAGCTGGT GAGTCTGGAGAGGATTTGGTGCAGCCTGGAGGTCAATTAAGACTTCATGTGACCCCTCTGGATTCACCTTC AATAAGTACGGCAATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCCGATAAGAAAGT </p>
					<p> AAATAATAATATGCAACATATATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTTCCACCACTCCAGAGATGATTCA AAAACACTGCCCTATCTACAAAATGAACAACCTTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGTGTGAGACAT GGGAACCTCGGTAAATAGCTACATACTTACTGGCTTACTGGGCAAGGGACTGTGGTCAACCGTCTCCCTCA GGTGTGGTGTCTGGCGCGGGCTCCGGTGGTGTCTCAGACTGTGTGACTCAGAAACCTTCA CTACCCGTATCACCTGGTGAACAGTACACTCACTTGTGGCTCTCCACTGGGCTGTACACTTGGCAAC TACCCAACTGGTCCAAACAAACAGGTCAGGACCCCGTGGTCTAATAGGTGGACTAGTTCCTCCGCC CCCGTACTCCTGCCAGATCTCAGGCTCCCTGTGGAGCAAGGTCGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAG CCAGAGGATGAGGCAGAAATTTACTGTGTCTATGTTACAGCAACCCGCTGGGTTCGGTGGAGAAACCCAAA CTGACTGTCTTACATCATCACCATCATCAT </p>
69	CD4(1+2)LSA21 etiqueta His	LxaCD3 x	artificial	AA	<p> KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIOFHKMNSQIKILGNQSFITTKFSKLNDRADSRRLWDOGNFPLIK NLKTEDSDTYCEVEDQREVLVFLGLTANSDHLLQGSLLTLEPPGSSPSVQCRCRPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSCTWTCTVLQNKKEFKIDIVLAFQKAGGGSRLLIEDICLPRWGLWEDDSSGGGSEYQLV ESGGLVQPGSSKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPKGLFWARIRSKYNNIYIYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYCVRHGNFNSYI SYWAYGQGLTIVTVSSGGGSGGGGSSQTVVTQEPBS LTVSPGGTIVLTCGSSGTGAVTSGNYFNWVQKPEQAPRGLIGGTRKFLAPGTPARFSGSLGKKAALLTSGVQ PEDEAEYCYLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH </p>

70	CD4(1+2)LxSA2 1LxaCD3 x etiqueta His	artificial	NT	<p> AAAGAAAGTGGTGGTGGGGAAGAAAGGGGACACCGTGGAACTGACCTGGACCCGACCCAGAGAAAGTCCATC CAGTTCACCTGGAAGAAACAGCAACCAAGATCAAGATCCTGGCAACCCAGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCC AGCAAGCTGAACGACAGAGCCGACCTCTGGCCGAGCCCTGTGGACCCAGGGCAAATTTCCCACTGATCATCAAG AACCTGAAGATCGAGGACAGGACACCTACATCTGGAGGTGGAAGATCAGAAAGAAAGAGTGCAGCTGTG GTGTTGGCCCTGACCCCAACTCCGACACCCATCTGTGAGGGCCAGACCTGACCTGACACTGGAAGC CCTCCAGCCAGCCCCAGCTGTAGAACCCAGAGCCCCAGAGCAACAATCCAGGGCCGCAAGACCCTG AGCTGTCCCAGCTGAACTGAGGATAGCGGACCTGGACCTGTACCTGTGAGAAACCAGAAAAAGGTG GAGTTCAAGATCGACATCGTGGTGTGGCCCTCCAGAAAGCCGGGAGCCGGATCTGGCCGGAGGATCT GGGGAGCCGCTCTAGACTGATCGAGGATATCTGCCCTGCCAGATGGGGCTGTCTGTGGAGGATGATCT GGCGAGGGGAAGTGGGGGGGAGATCCGGAGTGGTGGATCCGAGTCCAGTGGTCCAGTCTGGAGTGGAGG GGAATGGTGCAGCCTGGAGGTCAITGAAACTCATGTGACCCCTTGGACTTCACTTCAATTAAGTACGCC ATGAACTGGTCCGCCAGCTCCAGAAAGGTTGGAATGGTGTGCTGCATAGAAATATAATTAAT TATGCAACATATATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATCAAAAAACACTGCC TATCTACAAATGAACAATGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACCTCCGT AATAGCTACATATCCCTACTGGCTTACTGGGGCAAGGACTCTGTTCAACCTCTCTCAGGTGGTGGTGT TCTGGCGGGGGCCCTCGGTGGTGGTCTCAGACTGTGTGACTCAGGAACCTCCTCAGCTCCGTTACA CCTGGTGAACAGTCACTACTTGTGGCTCTCAGCTGGGCTGTACATCTGGCAACTACCCAAACTGG GTCCAAACAAAACCAGGTGAGCCAGCCCGGTGGTCAATAGTGGGACTAAGTTCCTCGCCCGGTACTCCT GCCAGATCTCAGGCTCCCTGTGGAGGCAAGGCTGCCCTCACCTCAGGGTACAGCCAGAGGATGAG GCAGAAATTTACTGTGTTCTATGGTACAGCAACCGCTGGGTGTTCCGGTGGAGGAAACCAACTGACTGTCTTA CATCATCACCATCATCAT </p>
71	CD4(1+2)LxSA2 1LxaCD3 x His	artificial	AA	<p> KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIOFHWKNSQIKILGNQGSFLTRKPSKLNDRADSRRSIMDQNFPLIIK NLKIEDSDTYICEVEDEQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGSLLTLLTLESPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL </p>
	etiqueta			<p> SVSQLELQDSGTWCTVILQNKVFEFKIDIVVLAFAQAGGGGGGGGGGSRLLIEDICLPRWGCLWEDDS GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPKGLWVARIRSKYNN YATYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYTCVRHGFNSYISYWAYWGQFTLVTVSSGGG SGGGSGGGGQTVVTVQEPFLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYFNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLVSGVQPEDEAEYCYVLMYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH </p>

72	B12HL	artificial	NT	<p>CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGGAAGTGAAGAACAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCCAGGCC TCCGGCTACCGGTTCTCCAACCTTCGTGATCCACTGGGTGGACAGGCCCTGGCCAGAGATTCGAGTGGATG GGCTGGATCAACCCCTACAACGGCAACAAGAGTTCCTCCGCCAAGTTCAGGACAGAGTGAACCTTCACCCGCC GACACCTCCGCCAACACCCCTTACATGGAACCTCGGTCCCTGAGAACCCGCCACCCGCCCTGTACTACTGC GCCAGAGTGGCCCTTACTCTGGACGACTCCCGCCAGCAACTACATAGACGCTGTGGGCAAGGGC ACCACCGTGAATCGTCTCTGGCGCGGAGGATTCGGCGGAGGGAAGTGGCGGAGGGGCTCTGAGATC GTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACACTGTCTCTGAGCCCTGGCAGCGGGCCACCTTCTCTTGGCCGCTCTCC CACTCCATCCGGTCCAGACGGGTGGCTGGTATCAGCAAGCCAGCCAGGCTCTCCGGTGGTGTATCCAC GGCGTGTCCAAACCGGGCTCCGGCATTCGACAGATTCAGCGGGTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTG ACCATCACCCCGGTGGAAACCCGAGGACTTCGCCCTGTACTATTTGCCAGGTGTACCGCGCCCTCCTCCCTACACC TTCGGCCAGGGCACTAAGCTGGAACGGAG</p>
73	B12HL	artificial	AA	<p>QVQVIVOSGAEVKPKGASVKVSCQASGRFNFVHWRVQFQRFEMWGINFYNKKEFSRKFQDRVTFTA DTSANTAYMELRSLRSADTAVYICARVGPYSWDDSPQDNVYMDVWKGKTTVI VSSGGSGGGSGGGSEI VLTQSPGTLISLSPGERATFSCRSSHISIRSRVAVYQHKPQAPRLV IHGVSNRASGISDRFSSGSGTDFTL TITRVEPEDFALYQCQVYGASSYTFGQTKLERK</p>
74	B12HLxαCD3xS etiqueta His	artificial	NT	<p>CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGGAAGTGAAGAACAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCCAGGCC TCCGGCTACCGGTTCTCCAACCTTCGTGATCCACTGGGTGGACAGGCCCTGGCCAGAGATTCGAGTGGATG GGCTGGATCAACCCCTACAACGGCAACAAGAGTTCCTCCGCCAAGTTCAGGACAGAGTGAACCTTCACCCGCC GACACCTCCGCCAACACCCCTTACATGGAACCTCGGTCCCTGAGAACCCGCCACCCGCCCTGTACTACTGC GCCAGAGTGGCCCTTACTCTGGACGACTCCCGCCAGCAACTACATAGACGCTGTGGGCAAGGGC ACCACCGTGAATCGTCTCTGGCGCGGAGGATTCGGCGGAGGCGGGAAGTGGCGGAGGGGCTCTGAGATC GTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACACTGTCTCTGAGCCCTGGCAGCGGGCCACCTTCTCTTGGCCGCTCTCC CACTCCATCCGGTCCAGACGGGTGGCTGGTATCAGCAAGCCAGCCAGGCTCTCCGGTGGTGTATCCAC GGCGTGTCCAAACCGGGCTCCGGCATTCGACAGATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTG ACCATCACCCCGGTGGAAACCCGAGGACTTCGCCCTGTACTATTTGCCAGGTGTACCGCGCCCTCCTCCCTACACC TTCGGCCAGGGCACTAAGCTGGAACGGAGTCCGGAGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGGTCTGAGTCTGGA GGAGGATTTGGTGCAGCTGGAGGTTCAATGAACCTCTCATGTGCAGCTCTGGATTCACCTTCATAAAGTAC GCCATGAACCTGGTCCGACAGGCTCCAGGAAAGGTTTGGATGGTTCCTCCGATAAAGTAAATATATAT AATATGCAACATATATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTTACCACTCCAGAGATGATTCAAAAAACA GCCTATCTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGACACTGCCGTGTACTACTGTGTGAGACATGGGAACCTC GGTAAATAGCTACATATCTTACTGGCTTACTGGGCGCAAGGACTTGGTCAACCTCTCCAGTGGTGGT GGTCTGGCGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTCAGACTGTGTGACTCAGGAACCTTCACTACCCGTA TCACCTGGTGGAAACAGTCACTCACTGTGGTCTCCGACTGGGCTGTACATCTGGCAACTACCCCAAC TGGGTCCAAACAAAAACCAGGTCCAGGCACCCCGTGGTCTAATAGGTGGACTAAGTTCCTCGCCCCCGGTACT</p>

				<p> CCTGCCAGAAATTCAGGCTCCCTGCTGGAGCAAGGTCCTCCCTACCCCTCAGGGGTACAGCCAGAGGAT GAGCAGAAATATTAAGTGTCTATGTTACAGCAACCGTGGTGTTCGGTGGAGGAACCAAACTGACTGTC CTACGCCGTGATGAAGATATTTGCCCTGCCCGCTGGGCTGCCCTGTGGGAAGATGATCATCATCACCAATCAT CAT </p>
75	B12HLxaCD3xS A21 x etiqueta His	artificial AA		<p> QVQLVQSGAEYKKPGASVKVSQASGYRFSNFIHWVRQAPGQRFEMWGWINFYNGNKEFSAKFQDRVTFTA DTSANTAYMELRSLRSADTAVYCARVGPYSWDDSPQDNYMDVWGKGTFTIVSSGGGGSGGGSGGGSEI VLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRVAVYQHKPGQAPRLVTHGVSNRASGISDRFSGSGGTDFTL TITRVEPEDFALYQCQVYGASSYTFGGGTKLERKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLIKTEDTAVYICVVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLTVVSSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSSLIVSPGGTIVLTCCSSITGAVTSGNYPN WVOOKPGQAPRGLIGGTRFLAPGTPARFSGSLLGKKAALLTSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV LRLIEDICLPRWGCLWEDDHHHHH </p>
76	B12HLxaCD3xS A21	artificial AA		<p> QVQLVQSGAEYKKPGASVKVSQASGYRFSNFIHWVRQAPGQRFEMWGWINFYNGNKEFSAKFQDRVTFTA DTSANTAYMELRSLRSADTAVYCARVGPYSWDDSPQDNYMDVWGKGTFTIVSSGGGGSGGGSGGGSEI VLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRVAVYQHKPGQAPRLVTHGVSNRASGISDRFSGSGGTDFTL TITRVEPEDFALYQCQVYGASSYTFGGGTKLERKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLIKTEDTAVYICVVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLTVVSSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSSLIVSPGGTIVLTCCSSITGAVTSGNYPN WVOOKPGQAPRGLIGGTRFLAPGTPARFSGSLLGKKAALLTSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV LRLIEDICLPRWGCLWEDD </p>

77	B12LH	artificial	NT	<p>GAGATCGTGTGACCCAGTCCCGGACACACTGCTCTGAGCCCTGGGAGCGGGCCACCTTCTCTTGGCGG TCCGCCACTCCATCCGTCAGACGGGTGGCTGGTATCAGCACACAGCCAGGCCAGGCCCTCGGCTGGTG ATCCACGGGTGTCACACGGGCTCCGGCACTCCGACAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGCACCCGACTTC ACCTGACCATACCCCGTGAACCCGAGGACTTCGCCCTGTACTACTGCCAGGTGTACGGCCCTCTCC TACACTTCGGCCAGGCAACAAGTGGAAAGAAAGGGGAGGGCTCTGTGGCGGAGAAAGTGGAGGC GGAGGATCTCAGGTGCAGTGGTGCAGTCTGGCGCCAGTGAAGAAACCTGGCGCTCCGTGAAGGTCTCC TGGCAGGCCAGCGGCTACCGGTTCTCCAACCTGCTGATCCACTGGGTGGACAGGCACCTGGCCAGAGATT GAGTGGATGGCTGGATCAACCCCTACAACGGCAACAAGAGTTCTCCGCCAAGTCCAGACAGAGTGACC TTCACCGCCGACACCTCCGCCAACACCGCCCTACATGGAATGCGGTCCCTGAGAAAGCGCCACACCCGCTGTG TACTACTGTCCAGAGTGGCCCTACTCCTGGGACGACTCCCCCAGGACAATACTACTATGGACCGTGTGG GGCAAGGGCACTACCCGTGATCGTCTTCC</p>
78	B12LH	artificial	AA	<p>EIVLTQSPGTLISLSPGERATFSCRSHSIRSRVAVYQHQPAPRLVIHGVSINRASGISDRFSGSGGTD TLTIITRVEPEDFALYCYQYIGASSYTFGQGTKLERKGGSGGGSSQQLVQSGAEVKKPGASVKVS CQASGYRFSNFIHWVRQAPGQRFERFMGWINPYNKKEFSAKFQDRVITADTSANTAYMELRSLRSADTAV YYCARVGPYSWDDSPQDNYIMDVWGRGTVIVSS</p>
79	B12LHxaCD3xS etiqueta His	artificial	NT	<p>GAGATCGTGTGACCCAGTCCCGGACACACTGCTCTGAGCCCTGGGAGCGGGCCACCTTCTCTTGGCGG TCCGCCACTCCATCCGTCAGACGGGTGGCTGGTATCAGCACACAGCCAGGCCAGGCCCTCGGCTGGTG ATCCACGGGTGTCACACGGGCTCCGGCACTCCGACAGATTCTCCGGCTCCGGCAGCGCACCCGACTTC ACCTGACCATACCCCGTGAACCCGAGGACTTCGCCCTGTACTACTGCCAGGTGTACGGCCCTCTCC</p>

80	B12LHxaCD3xS A21 x etiqueta His	artificial	AA	<p>TACACCTTCGGCCAGGGCAACAAGCTGGAAGAAAGGGGGAGGGGGCTCTGGTGGGGAGGAAAGTGGAGGC GGAGGATCTCAGGTGCAGTGGTGCAGTCTGGCCGGAAGTGAAGAAACCTGGCGCTCCGTGAAGGTGTCC TCCAGGCCACGGCTACCGTTCACAACTTCGTGATTCCTACTGGTGGACAGCCACTGGCCAGAGATTC GAGTGGATGGCTGGATCAACCCCTACAACGGCAACAAGAGTTCCTCCGCCAAGTTCAGGACAGAGTGGACC TTCACCGCCGACACCTCCGCCAACCCCTACATGGAACTGGCTGGCTGAGAACCCGACACCCCTGTGG TACTACTGTGCCAGAGTGGGCCCCCTACTCTGGGACACTCCCCCCAGGACAACTACTACATGGACCTGGTGG GGCAAGGGCACTACCGTGTCTCCGGAGTGGTGGTCCGAGTCCGAGTCCAGTGGTGGTGGTGGTGGGAG GGAATGGTGCAGCCCTGGAGGCTATTGAAACTCTCATGTGAGCCCTGGATTACCTTCAATAAGTACCGCC ATGAACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGTTTGAATGGGTTCCTCGCATAGAAGTAAATATAATAAT TATCAACAATATATGCCGATTCAGTGAAGACAGAGTTCACCATCTCAGAGATGATTCAAAAACACTCGCC TATCTACAAATGAACAACCTGAAGACTGAGGACACTGCCGTGTACTGTGTGAGACATGGGAACCTTCGGT AATAGCTACATATCCTACTGGCTTACTGGGCCAAGGACTCTGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGT TCTGGCGGGGGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCAGACTGTGTGACTCAGGAACCTTCACACACCGTATCA CCTGGTGAACAGTCACTACTGTGGCTCCTCGACTGGGCTGTTCATCTGGCAACTACCCAAACTGG GTCCAAACAAACAGGTCAGGACCCCGTGGTCTAATAGGTGGACTAAGTTCCTCGCCCCGGTACTCCT GCCAGATTCAGGCTCCCTGGTGGAGGCAAGCTGCCCTCACCCTCAGGGTACAGCCAGAGGATGAG GCAGAAATTTACTGTCTATGGTACAGCAACCGTGGTGGTTCGGTGGAGGAAACCAACTGACTGTCTTA CGCCTGATTGAAGATAATTGCCCTCCCGGCTGGGCTGCCGTGGGAAGATGATCATCATCACCATCATCAT</p>
81	B12LHxaCD3xS A21 artificial	artificial	AA	<p>EIVLTQSPGTTLSLSPGERATFSCRSSHRSIRRRVAVYQHKEFQAAPRLVIHGVSNAASGISDRFSGSGGTDFF TLTIITRVEPEDFALYCOVYGASSYTFGQTKLERKGGGGGGGGGQQVQLVQSGAEVKKPGASVKRVK CQASGYRFSNFIHWVROAPGQRFEMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTADTSANTAYMEIIRLSRSDTAV YYCARVGPYSWDDSPQDNYMDVWGKTTVI VSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGFTFNKYA MNVYRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTI SRDSDKNTAVLQMNILKTEDTAVYYCVRHGDFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGQTVVQEPSTLVSPGGTIVLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQRPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFAPRFSGSLLGKKAALTLISGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLIVL RLIEDICLPRWGCLWEDDHHHHH</p>
81	B12LHxaCD3xS A21	artificial	AA	<p>EIVLTQSPGTTLSLSPGERATFSCRSSHRSIRRRVAVYQHKEFQAAPRLVIHGVSNAASGISDRFSGSGGTDFF TLTIITRVEPEDFALYCOVYGASSYTFGQTKLERKGGGGGGGGGQQVQLVQSGAEVKKPGASVKRVK CQASGYRFSNFIHWVROAPGQRFEMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTADTSANTAYMEIIRLSRSDTAV YYCARVGPYSWDDSPQDNYMDVWGKTTVI VSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAASGFTFNKYA MNVYRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYADSVKDRFTI SRDSDKNTAVLQMNILKTEDTAVYYCVRHGDFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGQTVVQEPSTLVSPGGTIVLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQRPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTFAPRFSGSLLGKKAALTLISGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLIVL RLIEDICLPRWGCLWEDD</p>

82	VRC01HL	artificial	NT	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCAGATGAGAAACCCGGCGAGAGCATGGGATCAGCTGCCGGGCC TCTGGATACGAGTTTCAATCGACAGCACTCTGAACTGGATCGGCTGGCCCTGGCAAGAGGCCCGAGTGGATG GGCTGGCTGAAGCCAGAGCGGAGCCGTTGAACTACGCCAGACCTTCAGGGCAGAGTGACCATGACCCCGG GACGCTACAGCGATACCGCCCTTCCTGGAACCTGGGAGCTGACCGTGGACGATACCGCCGTGTACTTCTGT ACTCGGGCAAGAACGCCACTACAACCTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCACCCCTGTGATCGTGTCT AGCGAGGGCGGAGGATCTGGCGGGGAGGCTCTGGGGGAGGCGGAGGAGATCGTGTGACCCAGAGCCCT GGCACCTGAGCCTGTCTCCCGGGAACCGGCATCATCAGCTGCAGAACCCAGCCAGTACCGCAGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAGGCCAGGCCAGGCCCTCCAGCTCGTGTATACAGTGGAGCACCCAGAGCCCGCGAATC CCCGACCGGTCTCTGGTCCAGATGGGGCCCTGACTACAACCTGACCATCAGCAACCTGGAAAGCGGCGAC TTCGGCGTGTACTACTGCCAGCAGTACGAGTCTTCGGCCAGGCCACCAAGTCCAGGTGGACATCAAG</p>
83	VRC01HL	artificial	AA	<p>QVQLVQSGGQMKKPEESMRI SCRAQYEFIDSTLNWIRLAFGKRPEWGWMLKPRGGAVNRYARFLQGRVTWTR DVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTFGKNADYNWDFEHWGRGTPVI VSSGGGGSGGGGSEIVLITQSP GTLSPGETALISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDPYNLTI SNLESGD FGVYICQQYEFFGQIKVQVDIK</p>

84	VRC01HLxaCD 3xSA21 x etiqueta His	artificial	NT	<p>CAGTGCAGTGGTGCAGTCTGGCGCCAGATGAAGAAAACCCGGGAGAGCATGGGATCAGTGGCCGGGCC TCTGGATACGAGTTCACTGACACAGACTCTGAATGGATCCGGCTGGCCCTGGCAAGAGGCCGAGTGGAFG GGTGGCTGAAGCCAGAGCGGAGCCGTGAATACGCCAGACCTCTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCCCGG GACGCTACAGCGATACCCCTTCCCTGGAACCTGGGAGCCCTGACCCGTGGACGATACCAGCCGTACTTCTCT ACTCGGGCAAGAACCCGACTACAATGGACTTCGAGACTGGGAGAGGACCCCGCTGATCGTGTCT AGCGAGGGGAGGATCTGGCGGGGAGGCTCTGGGGAGGCGGAGGAGTCTGTGCTGACCCAGAGCCCT GGCACCTGAGCTGCTCCCGGGAAACCCGCATCATCAGCTGCAGAACAGCCAGCTACGGCAGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAGCCAGGCCAGGCCCCAGACTCGTGTACTACAGTGAAGCACCAGAGCCCGCGGAATC CCCACCCGTTCTTGGTCCAGATGGGGCCCTGACTACACCTGACCATCAGCACTGGAAGCCGGGAGC TTCCGGGTGACTACTGCCAGCAGTACGAGTCTTCCGCCAGGCCAACAGGTCAGGTTGACATCAAGTCC GGAGTGGTGGATCCGAGTCCAGTGGTGGTGGTGGAGGAGGATGGTGCAGCTGGAGGTCATTGAAA CTCATGTGCAGCCCTGGATTCACCTCAATAAGTACCCATGAATGGTCCCGCAGGCTCCAGGAAAG GGTGTGAAATGGTGTGCATAGAAGTAAATAATAATATGCAACATATATGCCGATTCAGTGA GACAGGTTCAACATCCAGAGATGATCAAAAACACTGCCATCTACAATGAACAACCTTGAAGACTGAG GACACTGCCGTACTACTGTGTGAGACATGGAACTTCGGTAATAGTACATACTACTGGGCTTACTGG GCCAAGGACTCTGGTCACTCTCTCAGGTGGTGGTCTGGCGCGGGCCCTCCGGTGGTGGTGGT TCTCAGACTGTTGACTCAGGAACCTCACTCACCCGTATCACCTGGTGAACACACTCACACTTGTGGC TCCTCAGACTGGGCTGTTACATCTGGCAACTACCCAACTGGGTCCAACAACACAGGTCAGCACCCCGT GGTCTAATAGTGGGACTAAGTTCCTCGCCCCGGTACTCCTGCCAGATTCACAGCTCCCTGCTGGAGC AAGCTGCCCCACCCCTCAGGGTACAGCCAGAGGATGAGGCAGAAATTAATCTGTTCTATGTTACAGC AACCGTGGGTGTTCCGTGGAGAACCAACTGACTGTCTCCTACGCCCTGATGAAGATATTTGCCCTGCCCGC TGGGCTGCCCTGTGGGAAGATGATCATCATCATCAT</p>
85	VRC01HLxaCD 3xSA21 x etiqueta His	artificial	AA	<p>QVQLVDSGGMKKPFESMRLISCRASYEFIDSTLNWIRLAFGKRPEWMLKPRGGAVNYARPLQGRVTMTR DVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCIRKKNADYNWDFEHWGRGTPVIVSSGGGGGGGGGGSEIVLITQSP GTLSLSPGETAIIISRTSYGSLAWYQRPQAPRLVIYSSSTRAAGIPDRFSGSRWGPDYNLTI SNLESGD FGYYCQOYEFFGQTKYQVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYANNWVROAPGK GLEWVARI RSKYNNYATYADSVKDRFTI SRDSDKNYAYLQMNLIKTEDTAVYCVRHGNGNSYI SYWAYW GQGLIVTVSSGGGGGGGGGSSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPR GLIGGTKFLAEGTPTARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEYICVLWYSNRWVFGGKTLTVLRLIEDICLPR WGC LWE DDDHHHHHH</p>

86	VRC01HLxaCD 3xSA21	artificial	AA	<p>QVQLVQSGGKMKPEGMRI SCRASGYEFIDSTLNWIRLAFPKRPEWMLKPRGAVNYARPLQGRVTMTR DVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCIRGKNADYNWDFEHWGRGTPVIVSSGGGGGGGGSEIIVLTQSP GTLSLSPGETAIIISRTSQYSSLAWYQORPQQAPRLVIYSGSTRAAGLPDRFSGSRWGPDYNI LTI SNIEGSD FGVYVQOQYEFEGQTKVQVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGTFNKYANWVRQAPGK GLEWVARI RSKYNNYATYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMNILKTEDTAVYYCVRHHGNGFSYISYWAYW GQGLVTVSSGGGGGGGGGSGQTVVTFEPLSLTVSPGGTVLLTCSSTGAVTSGNYPNWVQOKPGQAPR GLIGGKFLAFTPARFSGSLLGGKAAALTL SGVQPEDEAEYICVLIWYSNRWVFGGKTLTVLRLLIEDICLPR WGLWEDD</p>
87	VRC01 LH	artificial	NT	<p>GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCGCCAGCCCTGAGCCCTGTCCAGGGCAGACAGCCATCATCAGCTGCCGG ACCAGCCAGTACGGCAGCCTGGCTTGGTATCAGCAGAGGCCAGGACAGGCCCGCCAGACTCGTCACTACTCT GGAAGCACCCAGAGCCCGGAAATCCCGACCCGTTCTCTGGATCCCGCTGGGCCCTGACTACAACCTGACC ATCAGCAACCTGGAAAAGCGCGACTTCGGCGTGTACTACTCCAGCAGTACGAGTCTTCGGCCAGGGCACC AAGTCCAGGTGGACATCAAGGGCGGAGCGGATCTGGCCGAGGAGGAAAGCGGAGGAGGATCTCAGGTG CAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCAGATGAAGAACCCGGCCAGAGCATCGGGATCAGTGCAGAGCCTCTGGA TACGAGTTTCATCGACAGCATCTGAACTGGATCGGCTGGCCCTGGCAAGAGGCCCGAGTGGATGGCTGG CTGAAAGCCAGAGCCCGGACCCGTGAACTACCCAGACCTTGCAGGGCAGAGTACCATGACCCGGGACGTC TAGAGCATACCCCTTCTTGGAACTCGCGAGCCTGACCCGTGACATACCCCGCTGTACTTCTGTACTCGG GGCAAGAACCGCGACTACAACCTGGGACTTCGAGCAGTGGGCAGAGGACCCCGCTGATCGTCTCCTCC</p>
88	VRC01 LH	artificial	AA	<p>EIVLTQSPGTL LSLSPGETAIIISRTSQYSSLAWYQORPQQAPRLVIYSGSTRAAGLPDRFSGSRWGPDYNI L I SNLESGDFGVYVQOQYEFEGQTKVQVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGTFNKYANWVRQAPGK YEFIDSTLNWIRLAFPKRPEWMLKPRGAVNYARPLQGRVTMTRDYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTR GKNADYNWDFEHWGRGTPVIVSS</p>

89	VRC01LHxaCD 3xSA21 x etiqueta His	artificial	NT	<p>GAGATCGTGGTACCACAGACGCCCCGGACACCTGAGCCCTGTCTCCAGGGAGACAGCCATCATCAGCTGCCGG ACCAGCCAGTACGGCAGCTGGCTTGGTATCAGCAGAGGCGAGGAGCCCCCAGACTCGTATCTACTCT GGAAGCACAGAGCCCGGAAATCCCGACCCGGTCTCTGGATCCCGTGGGCCCTGACTACAACCTGACC ATCAGCAACCTGGAAAGCGGCACITCGCGGTGTACTACTGCCAGCATACGAGTCTTCGGCCAGGGCCACC AAGTCCAGTGGACATCAAGGGGAGCGGATCGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATCTCAGGTG CAGCTGGTGCATCTGGCGCCAGATGAAGAAACCCCGGAGAGCATCGGATCAGCTGCAGACCTCTGGGA TAGAGTTCATGACAGCACTTGAATCCGGTGGCCCTGGCAGAGGCGGAGTGGATGGGCTGGG CTGAAGCCCCAGGGGAGCCGTGACTACGCCAGACCTTGCAGGGCAGAGTACCATGCCGGGAC TACAGCATACCGCTTCTGGAACTGGGAGCTGACCGTGGACGATACCCCGGTGTACTTGTACTCGG GGCAGAAGCCGACIACAACGGGACTTCGAGCACTGGGCGAGAGGACCCCGGTGATCGTCTCCGGA GGTGGTGGATCCGAGGTGAGCTGTGAGTGGAGGAGGATGGTCAGCCCTGGAGGGTCAITGAAACTC TCAITGTCAGCCTCTGGATCACCTCAATAAGTACGCCATGAACCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGT TTGGAAATGGGTGCTCGAATAAGTAATAATAATAATGCAACATAATATGCCGATTCAGTGAAGAC AGTTTCAACATCCAGAGATGATCAAAAACACTGCCATCTACAATGAACAACTTGAAGACTGAGGAC ACTCCGTGTACTACTGTGAGACATGGAACTTCGGTAA TAGCTACATATCTACTGGGCTTACTGGGGC CAAGGACTCTGGTCAACCTCTCCTCAGGTGGTGGTCTGGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGTCT CAGACTGTTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTATCACCTGGTGGAAACAGTCACTCACTTGTGGCTCC TCGACTGGGGCTGTTACATCTGGCAACTACCCAAACTGGGTCCAAACAAAACCCAGGTCAGGCACCCCTGGT CTAATAGGTGGACTAAGTTCCTCGCCCGGTTACTCCTCCAGATTCAGGCTCCCTGGTGGAGCAAG GCTGCCCTCACCTCTCAGGGGTACAGCCAGAGATGAGCAGAAATATACTGTGTTCTATGGTACAGCAAC CGCTGGTGTTCGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCTCTACGCTGATGAAGATATTTGCCCTGCCCGCTGG GGCTGCCCTGTGGGAGATGATCATCACCATCATCAT</p>
90	VRC01LHxaCD 3xSA21 x etiqueta His	artificial	AA	<p>EIVLTQSPGTTLSLSPGETAIISRTSQYGSGLAWYQQRPQAPRLVIYSGSTRAGTIPDRFSGSRWGPDYNI ISNLESGDFGVYCYQYFFGQTKVQVDIKGGGSGGGGGGQVQLVQSGGQMKPKPGEISCRASG YETIDSTLNWIRLAPGKPEWMLKPRGGAVNYARPLQGRVTMTRDYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCPR GKNADYNWDFEHWGRGTPVIVSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGTFNKYAMNWRQAPGK LEWYARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNMLKTEITAVYCYVRHGFNFSYIISWAYWG QGTLVTVSSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRG LIGGTFKFLAPGTPARFSGSLIGGKAAALTL SGVQPEDEAEYICVLWYSNRWVFGGGTKLTVLRLLIEDICLP GWLWEDDDHHHHH</p>

91	VRC01LHxaCD 3xSA21	artificial	AA	<p>EIVLTQSPGTTLSLSPGETAIISCRTSQYGLAWYQRPQAPRLVIYSGSTRAAAGIPDRFSGSRWGPDYNIIT ISNLESGDFGVYCYQQYEFFGQTRKVVQVDIKGGGGSGGGGGGSOVLVQSGGQMKKPKGEMRIISCRASG YEFIDSLNWIIRLAPGRPEWMMWILKPRGGAVNYARPLQGRVTMRDVIYSDTAFLELRSLVDDTAVYFCTR GKNADYNWDFEHWGRGTFPIVSSGGGSEVQIVESGGLVQPGSLKLSCAASGTFNKYAMNWRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNMLKTEITAVYVYVRHGNFNSYISYWA7WG QGTLVTVSSGGGSGGGGGGQTVVVTQEPISLTVSPGGTFTVLTCSSTGAVTSCNYPNWVQKPKGQAPRG LIGGKFLAPGTPARFSGSLLGKKAALTLISGVQPEDEAEYICVLWYSNWRVFGGKILTVLRLLIEDICLFRW GCLWEDD</p>
92	4E10HL	artificial	NT	<p>CAGGTGACGGTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAGACCCGGCAGCAGCGTCCCGTGTCTGCAAAGCT AGCGGGCGCAGCTTCAGCACCTACGCCCTGTCTGGTGGCCAGGCTCCTGGCAGAGCCCTGGAATGGATG GCGGAGTGATCCCCCTGCTGACCATCACCAACTACGCCCCAGATCCAGGCGGGATCACCATACCGCC GACAGAAGCACACGACCCCTACCTGGAAC7GAACAGCTGAGGCCGAGGACACCGCCGTACTACTGT GCCAGAGAGGCACAACAGGCTGGGCTGGCTGGGCAAACTATCCGAGCCTTTGCCCACTGGGGCCAGGGC ACAC7CGTGACAGTGTAGTGGCGCGGAGGATCTGGGGAGGGGAAGTGGGGAGGGGCTCTGAAATC GTGCTGACACAGAGCCACGACCTCTGTAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCTGAGCTGAGGCTAGAGCCAGC CAGAGCGTGGCAACAACAAGTGGCTGGTATCAGCAGCGGCCAGGCCAGGCACCTCGGCTGTGATCTAT GGCCCCAGCACAGACCTAGCCGCTGGCCGATAGATTTTCCGGCTGGCAGCGCCACCCGACTTCACCCCTG ACCATCTCCAGACTGGAACCCGAGACTTTGCCGTGTATTA7TGGCAGCAGTACGGCCACAGAGCCTGAGCACC TTTGGACAGGGCACCAAGGTGGAAGTGAAG</p>
93	4E10HL	artificial	AA	<p>QVQLVQSGAEVKKRPGSSVTVSCKASGGSFSTYALSWVRQAPRGRGLEWVGGVIFLLITITNYAPRFQGRITITA DRSTSTAYLELNSLRPEDTAVYYCAREGTTGWMLGKPIGAFAHWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGGSGGSELI VLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSYGNKLA7YQRPQAPRLLIYGASSRPSGVADRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDEFAVYCYQQYGGQSLSTTFGGTKVEVK</p>
94	4E10HLxaCD3x SA21 x etiqueta His	artificial	NT	<p>CAGGTGACGGTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAGACCCGGCAGCAGCGTCCCGTGTCTGCAAAGCT AGCGGGCGCAGCTTCAGCACCTACGCCCTGTCTGGTGGCCAGGCTCCTGGCAGAGCCCTGGAATGGATG GCGGAGTGATCCCCCTGCTGACCATCACCAACTACGCCCCAGATCCAGGCGGGATCACCATACCGCC GACAGAAGCACACGACCCCTACCTGGAAC7GAACAGCTGAGGCCGAGGACACCGCCGTACTACTGT GCCAGAGAGGCACAACAGGCTGGGCTGGCTGGGCAAACTATCCGAGCCTTTGCCCACTGGGGCCAGGGC ACAC7CGTGACAGTGTAGTGGCGCGGAGGATCTGGGGAGGGGAAGTGGGGAGGGGCTCTGAAATC GTGCTGACACAGAGCCACGACCTCTGTAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCTGAGCTGAGGCTAGAGCCAGC CAGAGCGTGGCAACAACAAGTGGCTGGTATCAGCAGCGGCCAGGCCAGGCACCTCGGCTGTGATCTAT GGCCCCAGCACAGACCTAGCCGCTGGCCGATAGATTTTCCGGCTGGCAGCGCCACCCGACTTCACCCCTG ACCATCTCCAGACTGGAACCCGAGACTTTGCCGTGTATTA7TGGCAGCAGTACGGCCACAGAGCCTGAGCACC TTTGGACAGGGCACCAAGGTGGAAGTGAAG</p>

95	4E10HLxaCD3x SA21 x SA21 etiqueta His	artificial	AA	<p>GACAGAAGCCACAGCACCGCCCTACCTGGAACTGAACAGCCCTGAGCCCGAGGACACCGCCCTGACTACTGTTGCCAGAGGGCACAAACAGGCTGGGCTGGCTGGGCAAACTATCGAGCCTTGGCCACTGGGGCCAGGGCACACTCGTACAGTCTAGTGGCGGGAGGATCTGGCGAGCGGGAAGTGGGGAGCGGGCTCTGAAATC GTGCTGACACAGAGCCAGCACCCAGTCTCTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACCCTGAGCTGTAAGAGCCAGC CAGAGCTGGCAACAACAAGCTGGCTGGTATCAGCAGCCAGCCAGCCAGCCCTGGCTGCTGATCTAT GGCCAGCAGCAGACCTAGCGGGTGGCCGATAGATTTCCGGCTTGGCAGCGCCACCGACTTCACCCCTG ACCATCCAGACTGGACCCCGAGGACTTTGCCCTGTATATATGCCCAGTACCGCCACAGCCTGAGCAGG TTTGGACAGGCCACCAAGGTGAAGTCCGAGGTGGATCCGAGTGGAGTCCGAGTGGCTGGCTGGTCTGGA GGAGGATGGTGCAGCCCTGGAGGTCATTTGAAACTCTCATGTGACCCCTGGATTCACCTTCAATAAGTAC GCCATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGTTTGGAAATGGTTCCTCGCATAAGAAGTAAATATAAT AATTATGCAACATATATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAAAACACT GCCTATCTACAAATGAACAACTTGAAGACTGAGACACTGCCGTGACTACTGTGTGAGACATGGGAACCTC GGTAATAGCTACATAICCTACTGGGCTACTGGGCCCCAAGGACTCTGGTCAACCCTCCTCAGTGGTGGT GGTTCGGCGGGCGGCTCCGGTGGTGGTTCAGACTGTGTGACTCAGGAACCTTCACTCACCGTAT TCACTGGTGAACAAGTACACTACTTGGCTCCTCGACTGGGCTGTACACTTGGCAACTACCCAAAC TGGGTCCAAACAAAAACCAGTTCAGGCAACCCCGTGGTCTAATAGGTGGACTAAGTTCCCTGCCCGGTTACT CCGCCAGATTCAGGCTCCCTGTGGAGCAAGGTCGCCCTCACCTCAGGGGTACAGCCAGAGGAT GAGCAGAAATATCTACTGTCTATGGTACAGCAACCGCTGGTGTTCGGTGGAGAACCAAACTGACTGTC CTACGCCCTGATGAAGATATTTGCCCTGCCCGCTGGGCTCCCTGTGGGAAGATGATCATCATCAACCATCAT CAT</p>
96	4E10HLxaCD3x SA21 artificial	artificial	AA	<p>QVQLVQSGAEYKRRPSSVTVSKASGGSFSTYALSWVRQAPFGRGLEWVGVIPLLTITNYAPRFQGRITITA DRSTSTAYLEINSLRPEDEFAVYICAREGTTGWGLGKPIGAFAHWGQTLVTVSSGGGGGGGGGGGGSEI VLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQRPQAPRLLIYGASSRPSGVADRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDEFAVYICQYQSLSTFGQGTKVEKSGGGSEVQLVQPGGSLKLSAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAYIYCVRHGNF GNSYISWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGQTIVTQEPSTLVSPGGTVILTCCSSTGAVTSGNYPN WYQKPGQAPRGLIGGTRFLAPGTPARFSGSLIGGKAALLTSLGVQPEDEAEIYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV LRLIEDICLPRWGCLWEDDHHHHH</p>
96	4E10HLxaCD3x SA21	artificial	AA	<p>QVQLVQSGAEYKRRPSSVTVSKASGGSFSTYALSWVRQAPFGRGLEWVGVIPLLTITNYAPRFQGRITITA DRSTSTAYLEINSLRPEDEFAVYICAREGTTGWGLGKPIGAFAHWGQTLVTVSSGGGGGGGGGGGGSEI VLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQRPQAPRLLIYGASSRPSGVADRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDEFAVYICQYQSLSTFGQGTKVEKSGGGSEVQLVQPGGSLKLSAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAYIYCVRHGNF GNSYISWAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGQTIVTQEPSTLVSPGGTVILTCCSSTGAVTSGNYPN WYQKPGQAPRGLIGGTRFLAPGTPARFSGSLIGGKAALLTSLGVQPEDEAEIYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV LRLIEDICLPRWGCLWEDD</p>

97	4E10LH	artificial	NT	<p> GAAATCGTGTGACACACAGAGCCCCAGGCACCCAGTCTCTGAGCCCTGGGAAAAGAGCCACCCCTGAGCTGTAGA GCCAGCCAGAGCGTGGGCAACAACAAGCTGGCCCTGGTATCAGCAGCGGCCAGGCCAGCCACCTCGGCTGGCTG ATCTATGGCGCCAGCAGCAGACCTAGCGCGTGGCCGATAGATTTCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACITC ACCCTGACCATCTCCAGACTGGAACCCGAGGACTTGGCCGTATTATTGCCAGCAGTACGGCCAGAGCCCTG AGCACCTTTGGACAGGGCACCAAGTGGAAAGTGAAGGGCGGAGGATCTGGCGAGGGCGGAAGTGGGGGA GGCGCTCTCAGGTGCAAGTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAACCCGGCAGCAGCGTACCCTGTCTC TGGAAAGCTAGCGGGGAGCTTCAGCACCTACGCCCTGTCTGGGTGGCCAGGCTCCTGGCAGAGGCCCTG GAATGGATGGCGGAGTGATCCCCCTGCTGACCATCACCACTACGCCCCAGATCCAGGGCCGGATCACCC ATCACCGCCGACAGAAGCACAGCACCCCTACTTGGAACTGAACAGCTGAGGCCCGAGGACACCCGCCGTG TACTACTGTGCCAGAGAGGGCACACAGGCTGGGGCTGGCTGGGCAAAACCTATCGGAGCCTTTGCCCCACITGG GGGCAGGGCACACTCGTGACAGTGTCTCC </p>
98	4E10LH	artificial	AA	<p> EIVLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQQRFQAPRLLIYGASSRPSGVADRFSGSGSGTDIF TLTISRLPEPEDFAVYYCQYQGSLSTFGQGTKVEVKGGSGGGSGGSSQVQLVQSGAEVKKRPFSSVTYS CKASGGSFSTYALSWVRQAPFGRGLEWGGVIPLLTITNYAPRFQGRITITADRSITSTAYLELNSLRPEDTAV YYCAREGTTGWGWLGPICAFAHWGQGLLVTVSS </p>

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende al menos tres dominios de unión comprendidos en una cadena de polipéptidos, donde
- 5
- (a) el primer dominio de unión es un dominio de unión que se une a una molécula de superficie celular en una célula diana; y
- (b) el segundo dominio es un dominio de unión que se une al complejo receptor CD3 de linfocitos T; y
- (c) el tercer dominio es un dominio de unión que se une a seroalbúmina, donde dicho tercer dominio se posiciona en
- 10 el extremo C de dicho segundo dominio,
- donde los tres dominios están en un polipéptido en orden desde el extremo N hasta el extremo C
- primer dominio de unión;
 - 15 • segundo dominio de unión; y
 - tercer dominio de unión.
2. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tercer dominio del anticuerpo biespecífico es un anticuerpo scFv o de dominio único.
- 20
3. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde
- (a) el primer dominio de unión se puede unir a la molécula de superficie celular en una célula de primate humano y no humano;
- 25 (b) el segundo dominio de unión se puede unir al complejo receptor CD3 de linfocitos T en una célula de primate humano y no humano, y
- (c) el tercer dominio de unión se puede unir a seroalbúmina de primate humano y no humano.
4. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el tercer dominio de unión capaz de unirse a seroalbúmina se deriva de un banco combinatorio o un dominio de unión a anticuerpo.
- 30
5. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el tercer dominio de unión comprende entre 10 y 25 residuos aa.
- 35
6. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde el tercer dominio de unión capaz de unirse a seroalbúmina comprende la secuencia de aminoácidos Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp, donde Xaa es cualquier aminoácido.
- 40
7. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde el tercer dominio de unión capaz de unirse a seroalbúmina se deriva de una CDR de un anticuerpo de dominio único.

8. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el tercer dominio de unión se une a seroalbúmina con una afinidad (KD) de ≤ 500 nM.
9. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la molécula
5 consiste en una cadena de polipéptidos única.
10. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el primer dominio de unión capaz de unirse a una molécula de superficie celular se une a un antígeno tumoral.
- 10 11. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el segundo dominio de unión capaz de unirse al complejo receptor CD3 de linfocitos T se puede unir a un epítipo de cadena CD3 ϵ humana y de *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* o *Saimiri sciureus*, donde el epítipo es parte de una secuencia de aminoácidos comprendida en el grupo compuesto por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, u 8 y comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu.
15
12. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por una secuencia de aminoácidos como se representa en las SEQ ID NO: 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 75, 76, 81, 82, 85, 86, 90, 91, 85, 96, 100 o 101.
- 20 13. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 13.
- 25 15. Una célula huésped transformada o transfectada con, y que comprende, la secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 13 o con el vector como se define en la reivindicación 14.
16. Un proceso para la producción de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo dicho proceso cultivar una célula huésped como se define en la
30 reivindicación 15 en las condiciones que permiten la expresión del anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y recuperar el anticuerpo producido a partir del cultivo.
17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o producido de acuerdo con el proceso de la reivindicación 16.
35
18. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o producido de acuerdo con el proceso de la reivindicación 16 para uso en la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad seleccionada de entre el grupo compuesto por una enfermedad proliferativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa y una enfermedad autoinmune.
40

19. Un kit que comprende un anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 13, un vector como se define en la reivindicación 14, o una célula huésped como se define en la reivindicación 15.

Figura 1 (1)

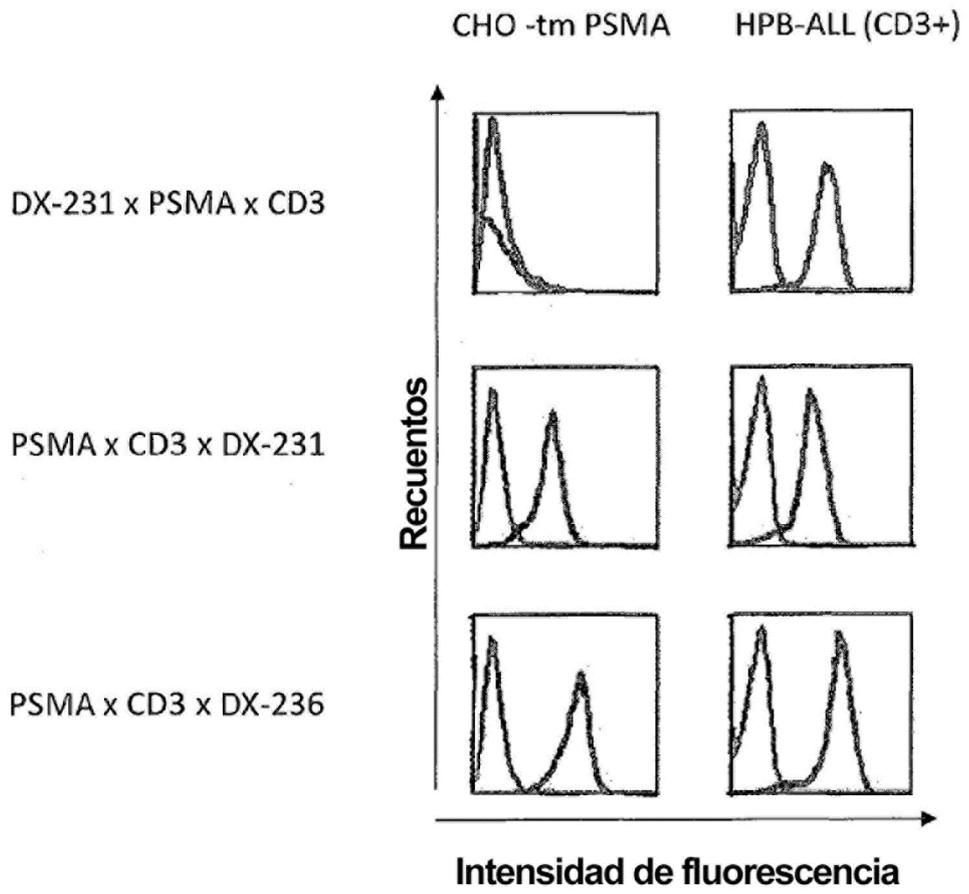


Figura 1 (2)

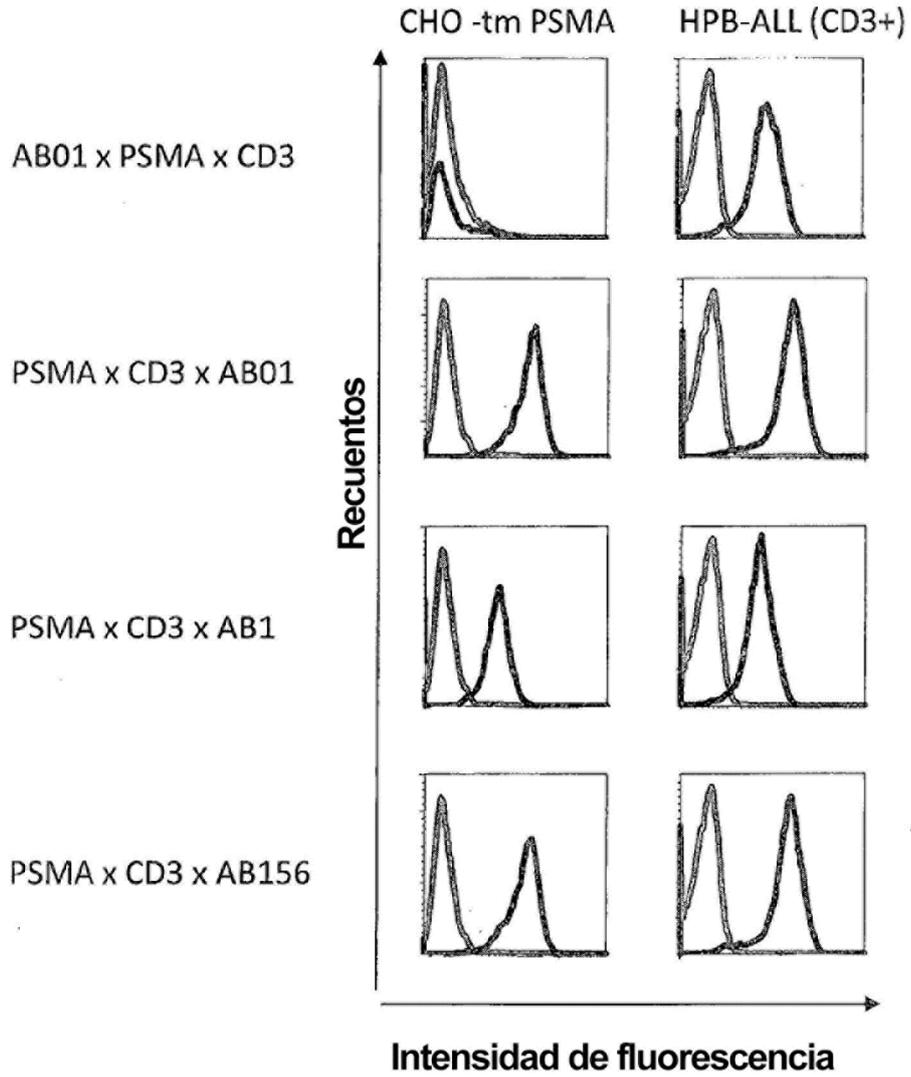


Figura 1 (3)

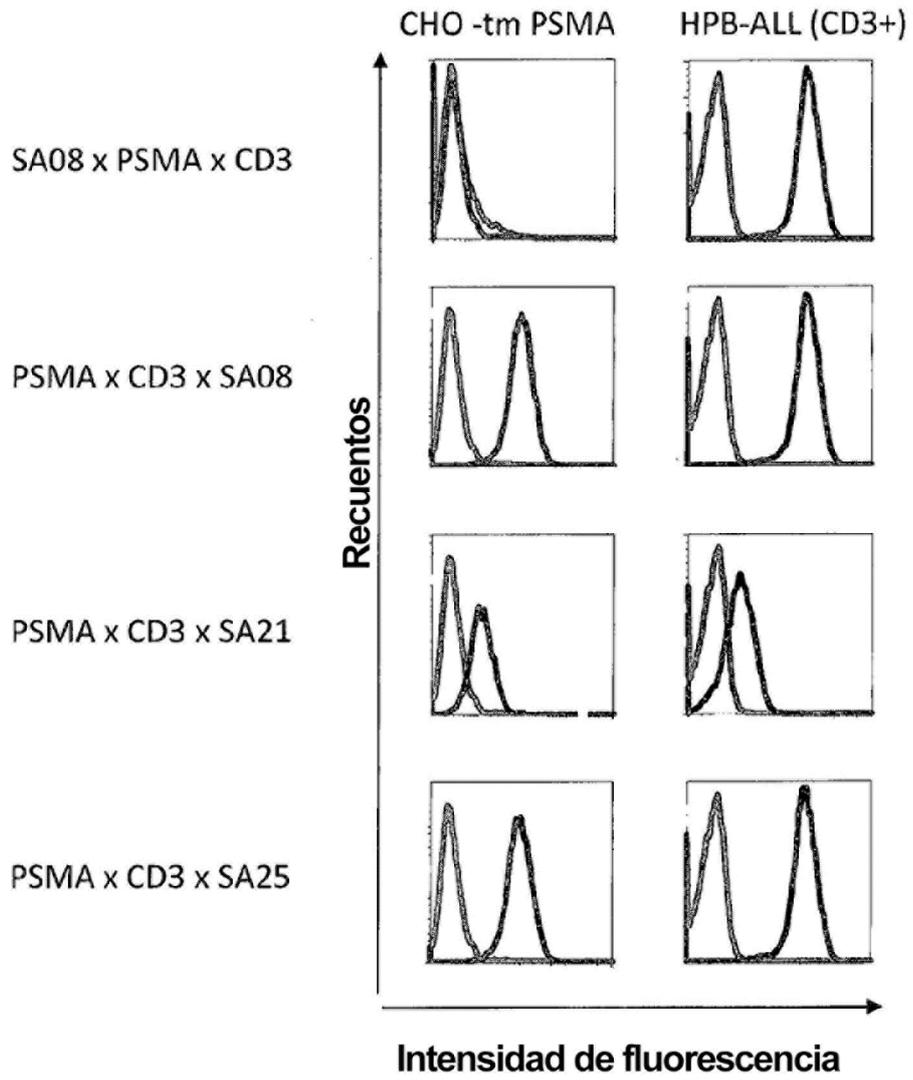
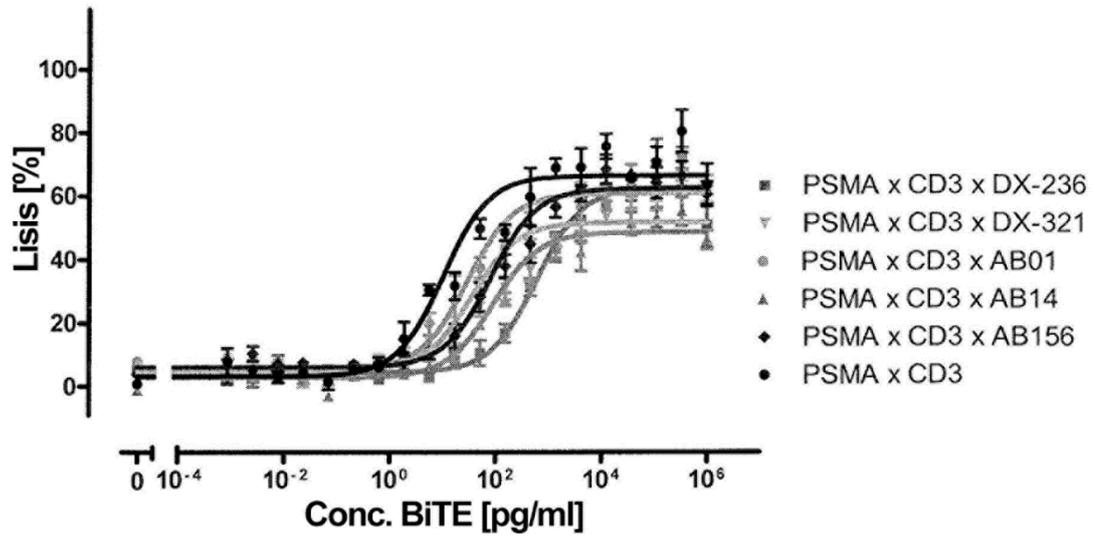


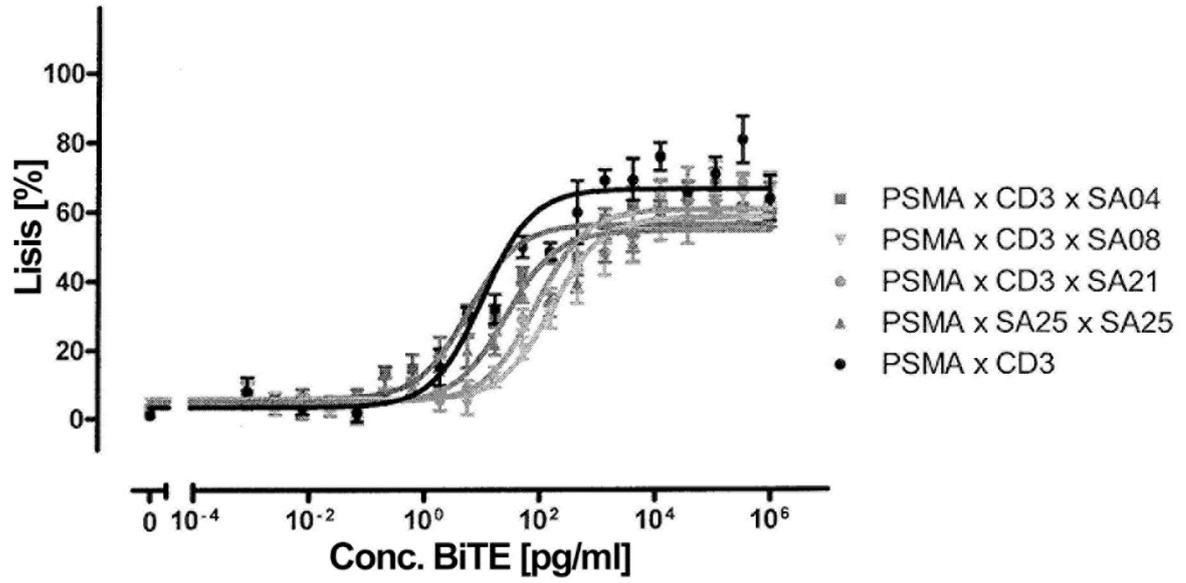
Figura 2 (1)



	PSMA X CD3 x DX236	PSMA X CD3 x DX-321	PSMA X CD3
EC50 [pg/ml]	599	35	10

	PSMA X CD3 x AB01	PSMA X CD3 x AB14	PSMA X CD3 x AB156	PSMA X CD3
EC50 [pg/ml]	29	88	81	10

Figura 2 (2)



	PSMA X CD3 x SA04	PSMA X CD3 x SA08	PSMA X CD3 x SA21	PSMA X CD3 x SA25
EC50 [pg/ml]	5,8	164	87	26

Figura 3

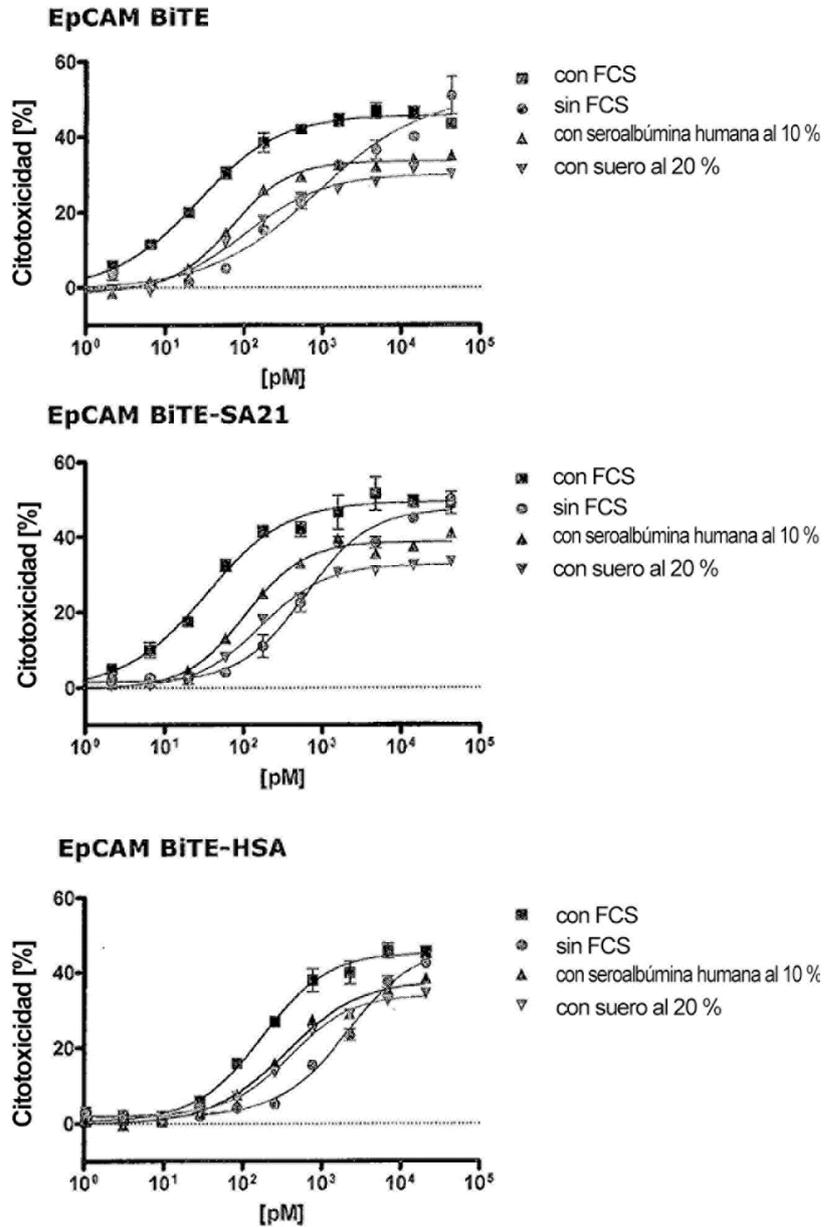


Figura 4

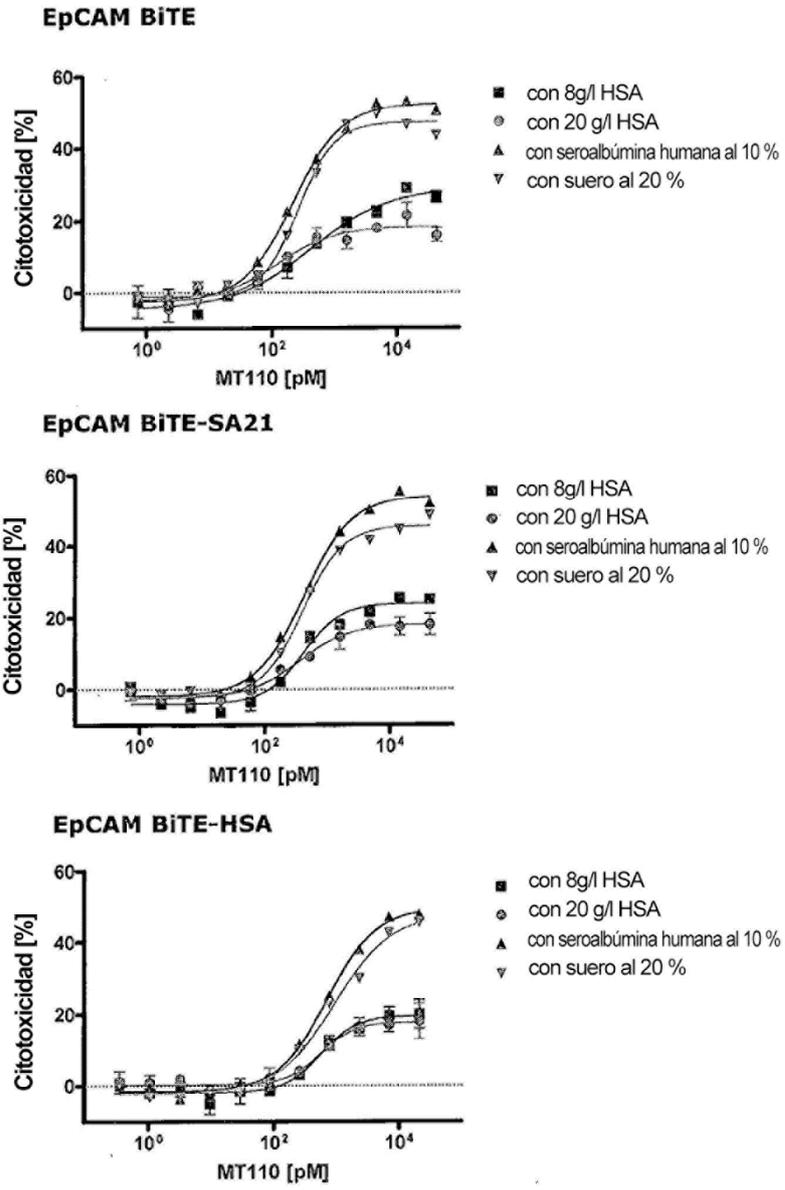


Figura 5 (1)

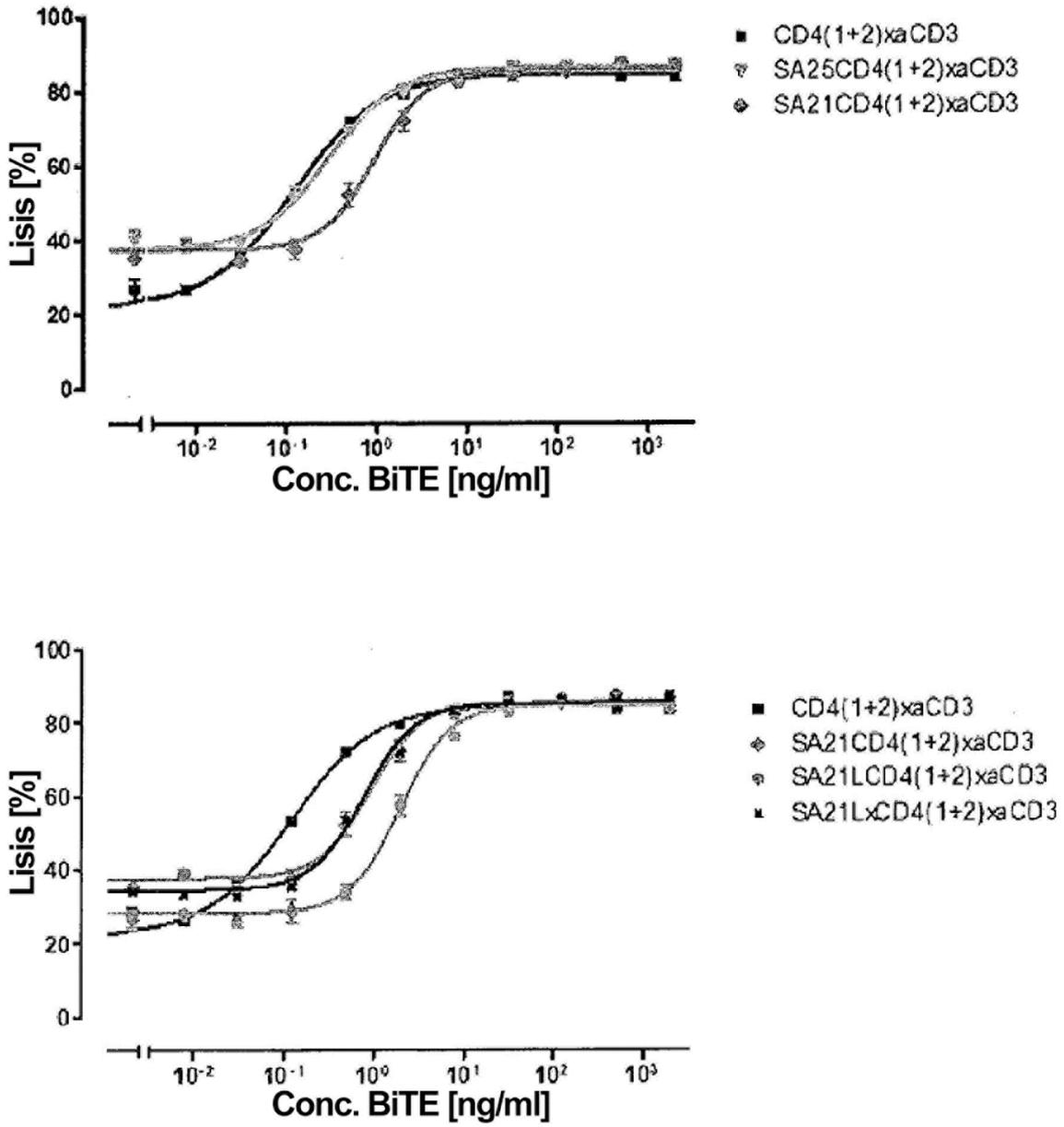


Figura 5 (2)

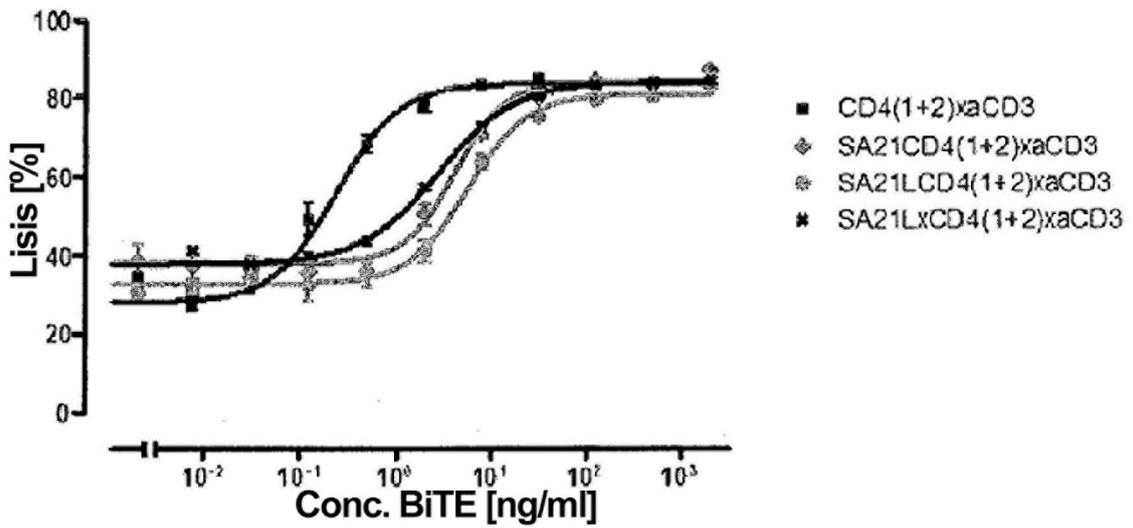
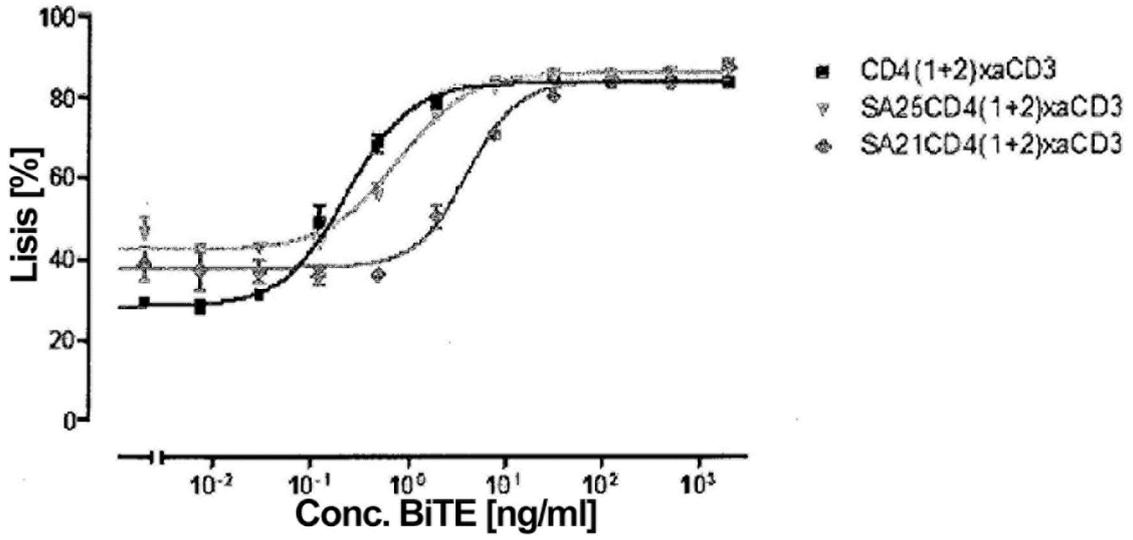


Figura 5 (3)

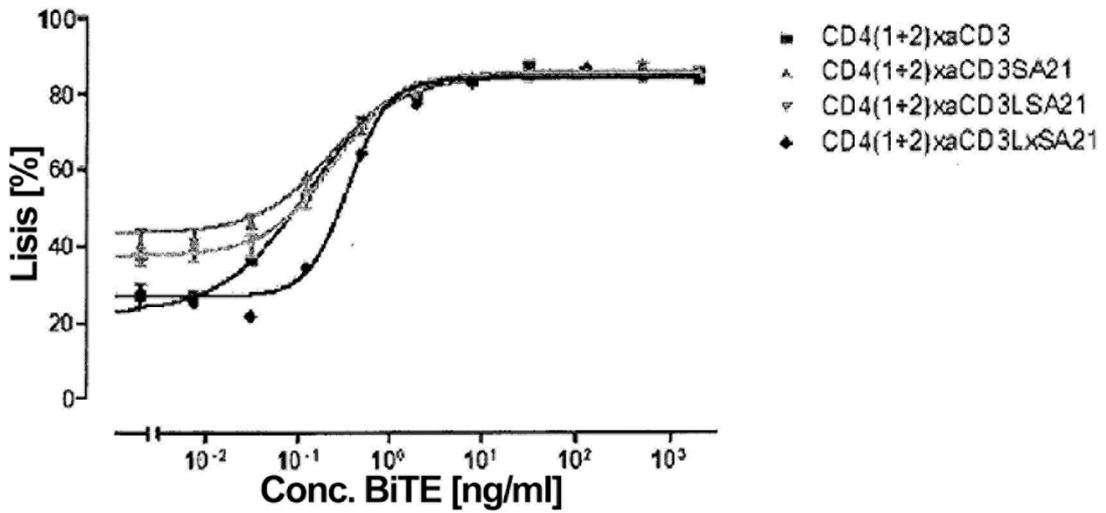
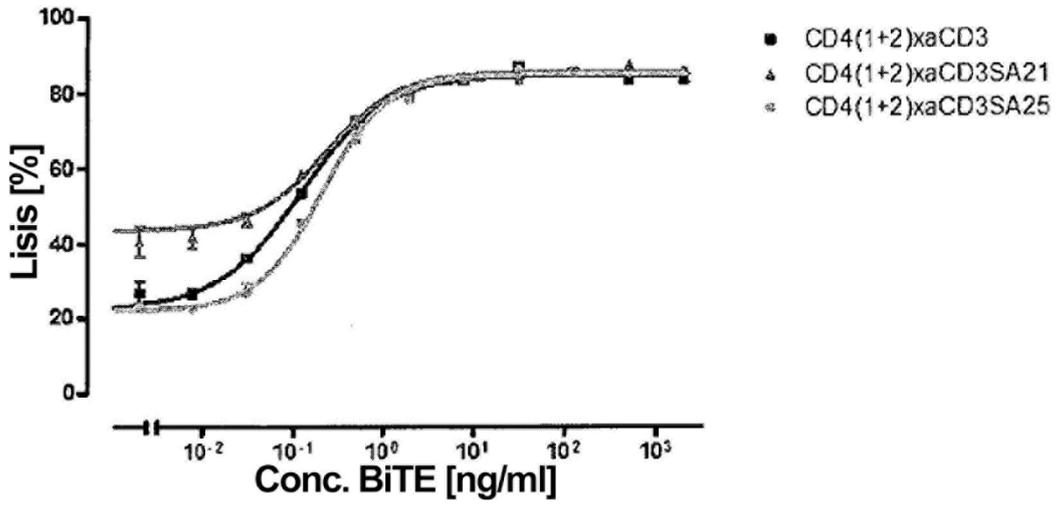


Figura 5 (4)

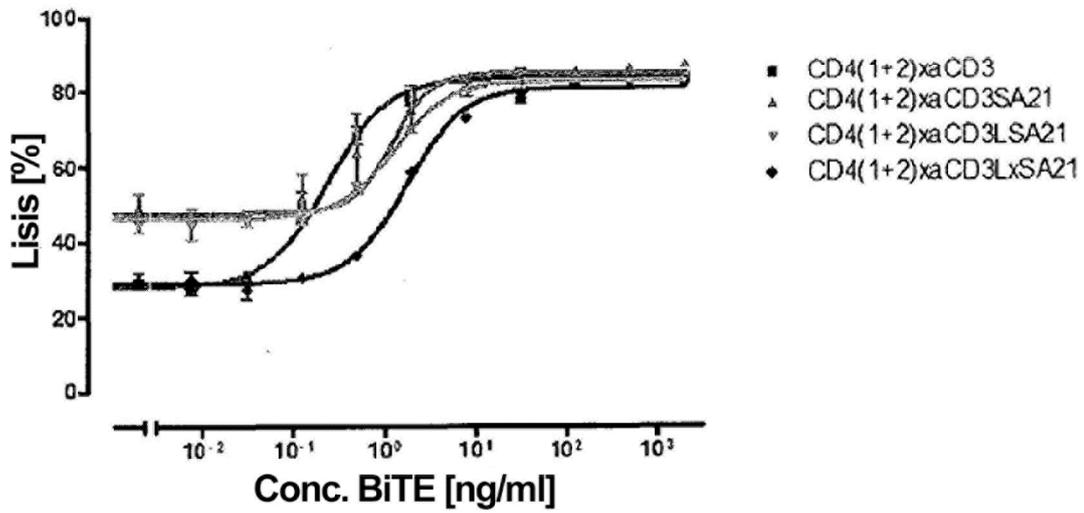
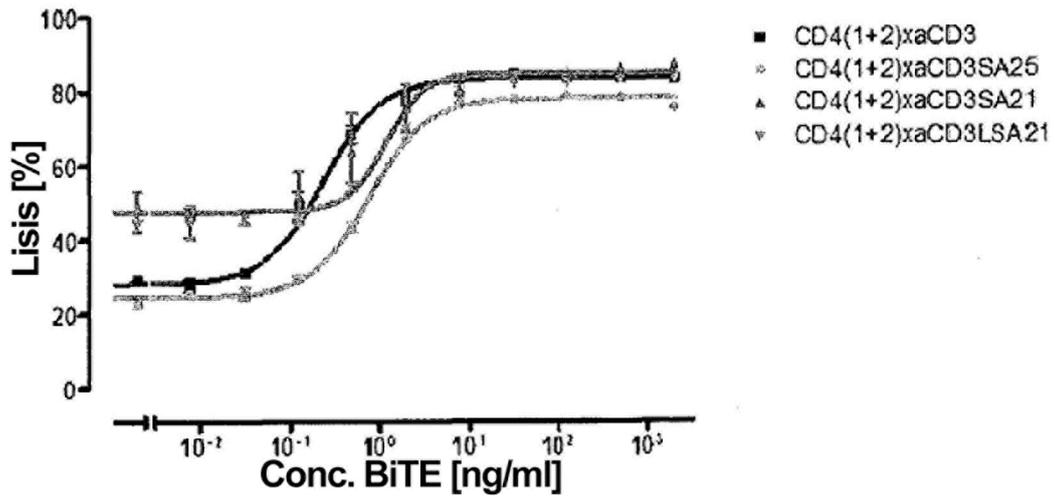


Figura 5 (5)

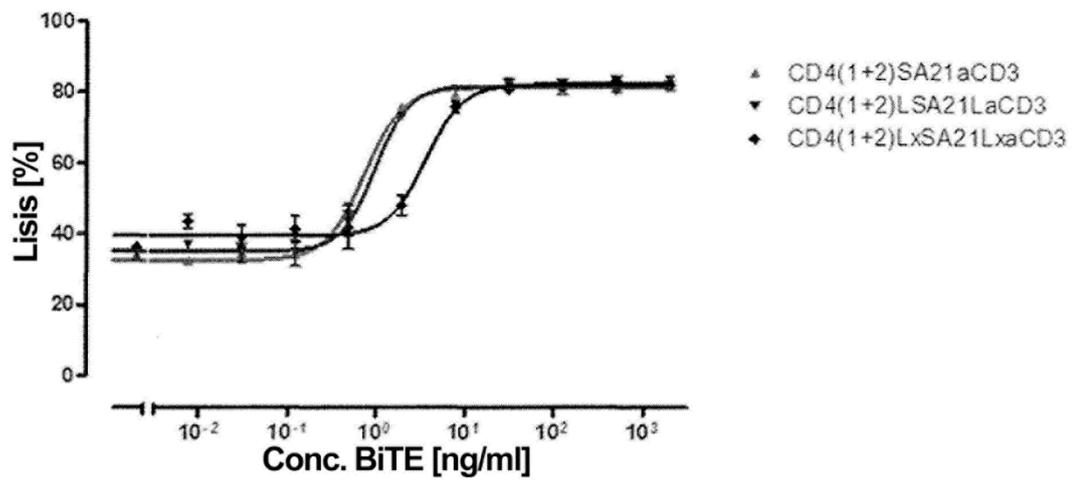
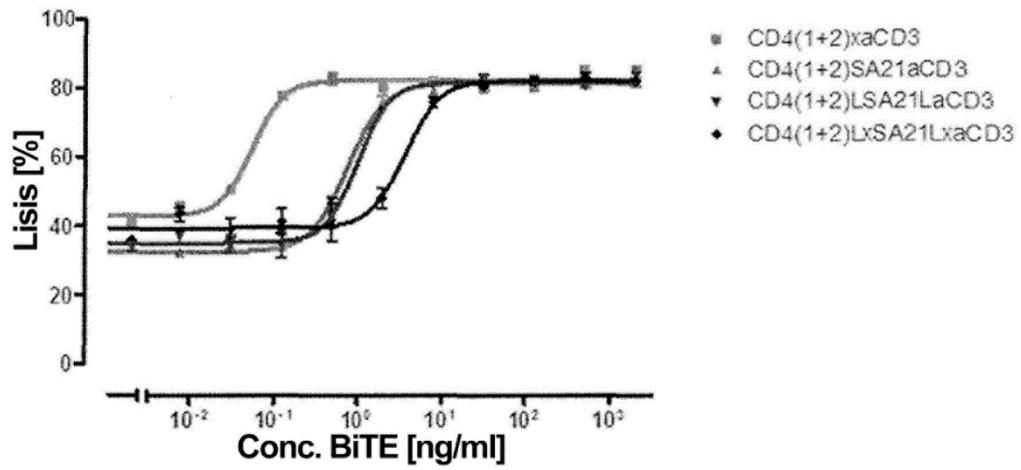


Figura 5 (6)

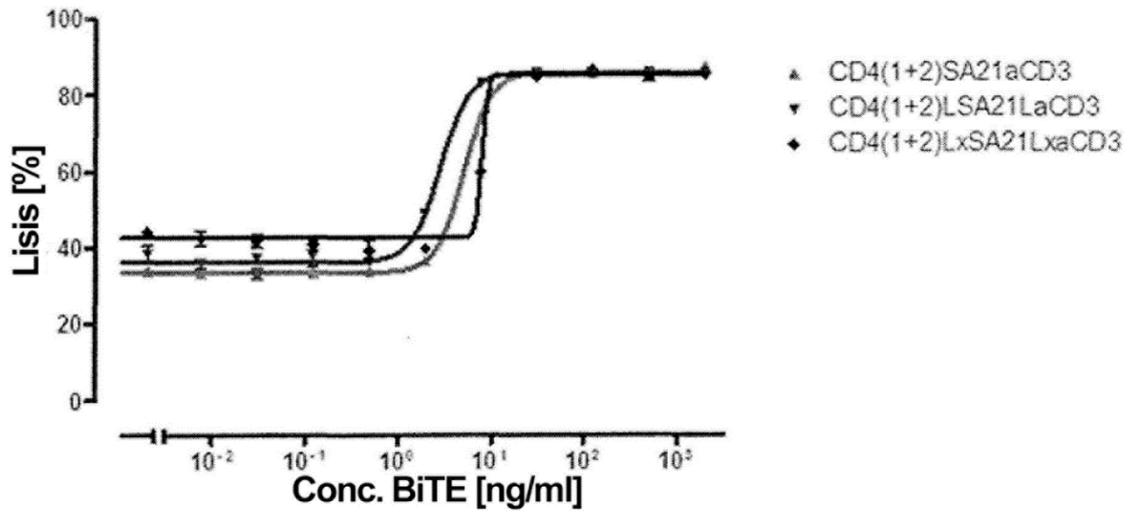
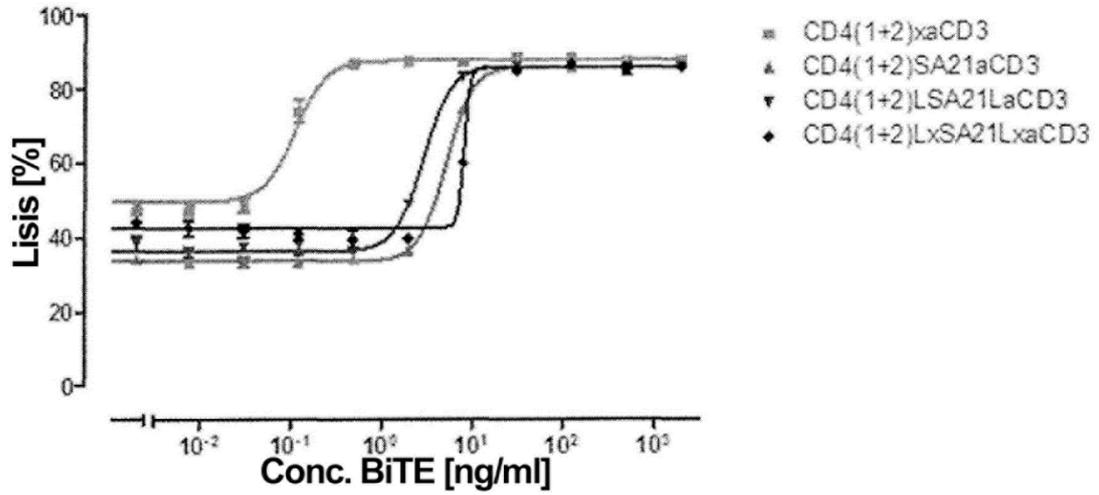


Figura 6 (1)

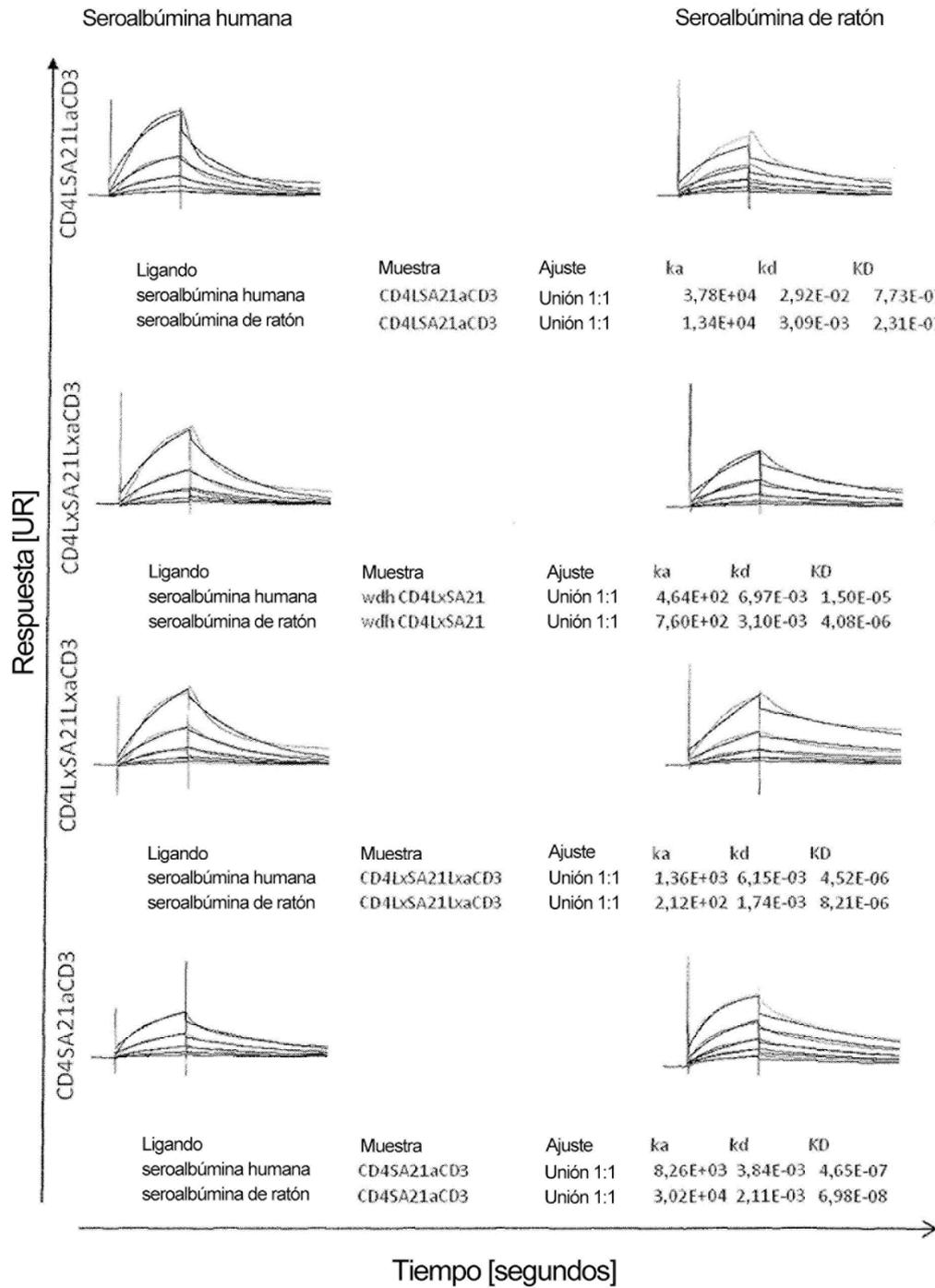


Figura 6 (2)

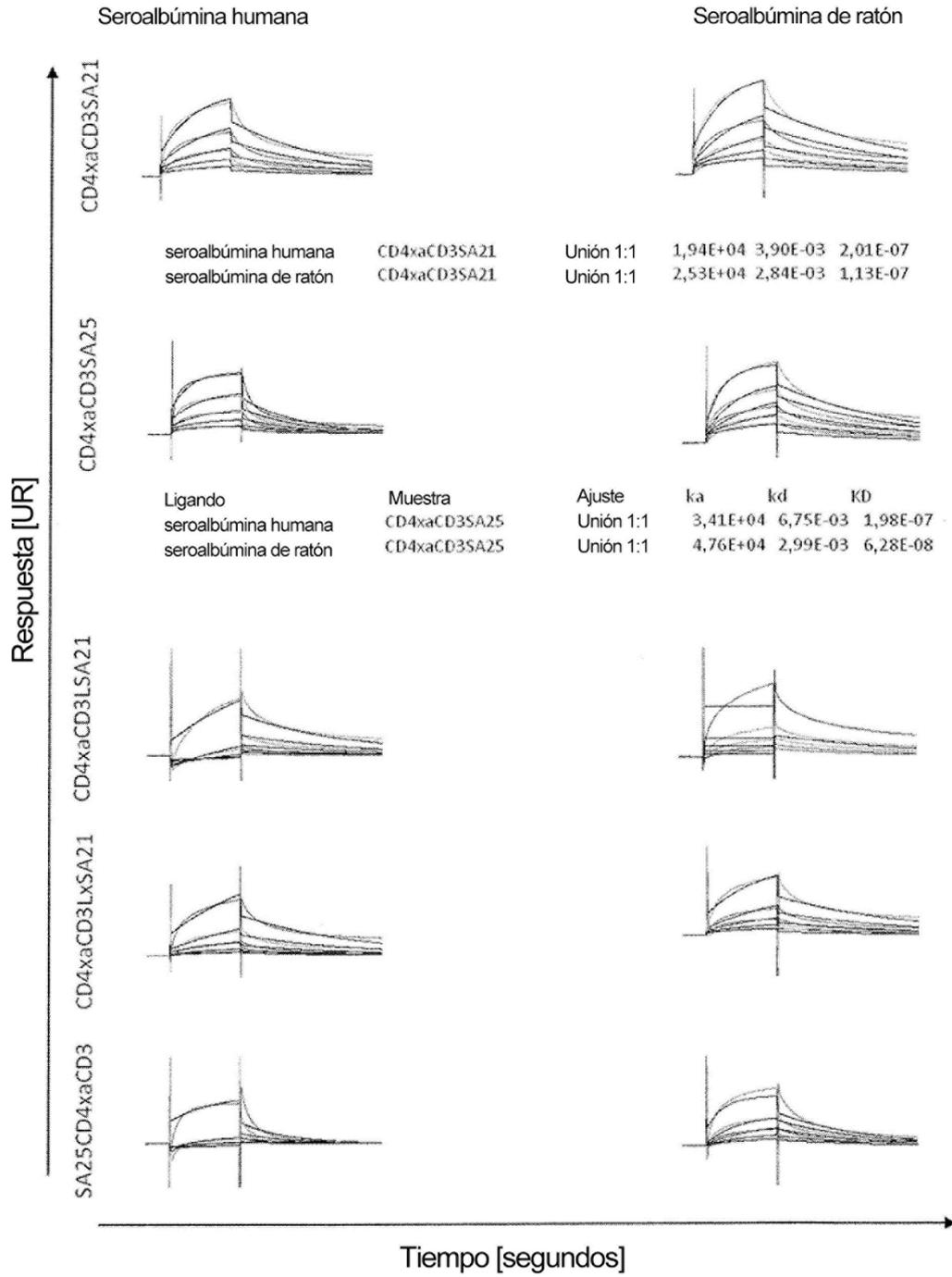


Figura 6 (3)

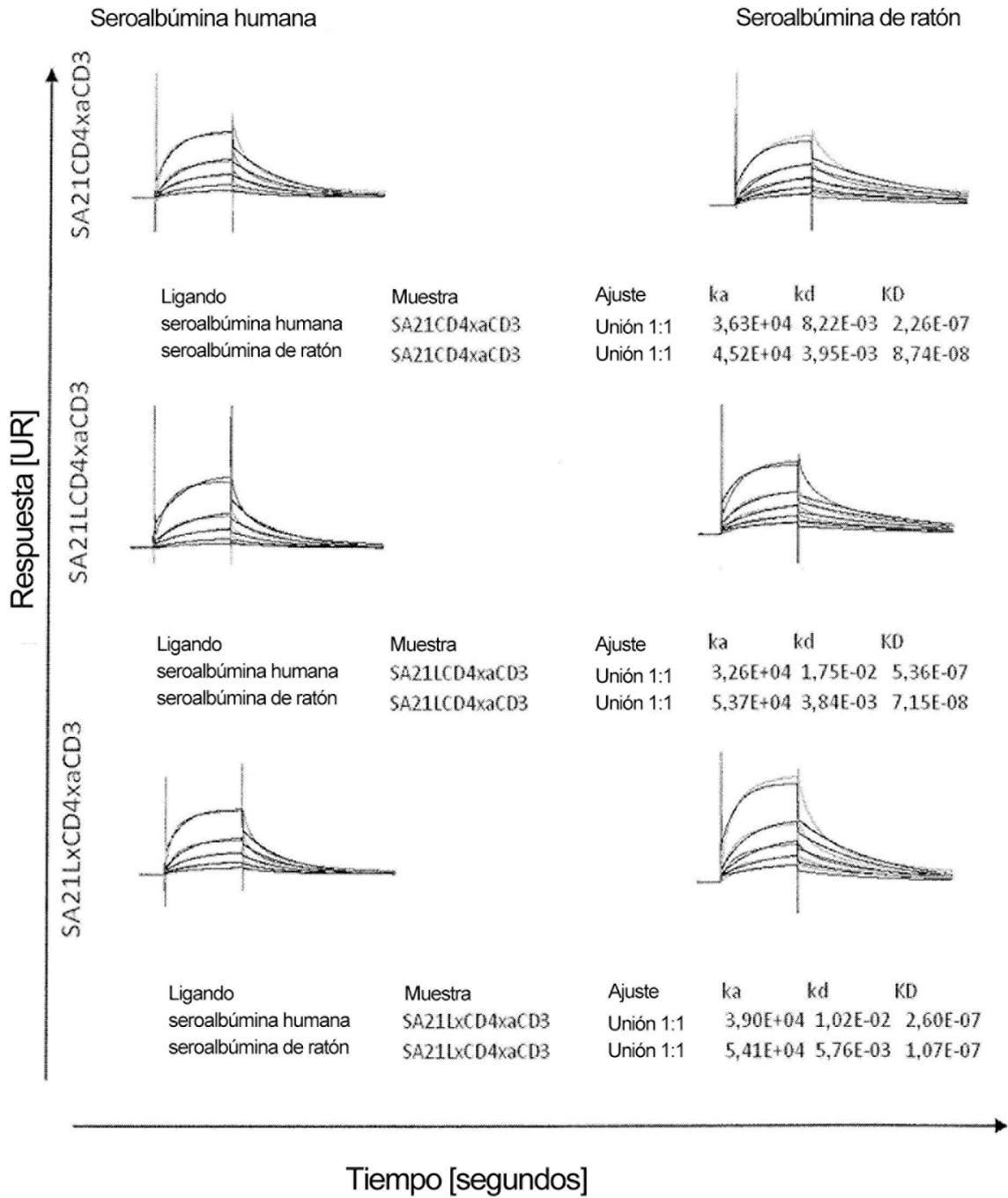


Figura 7

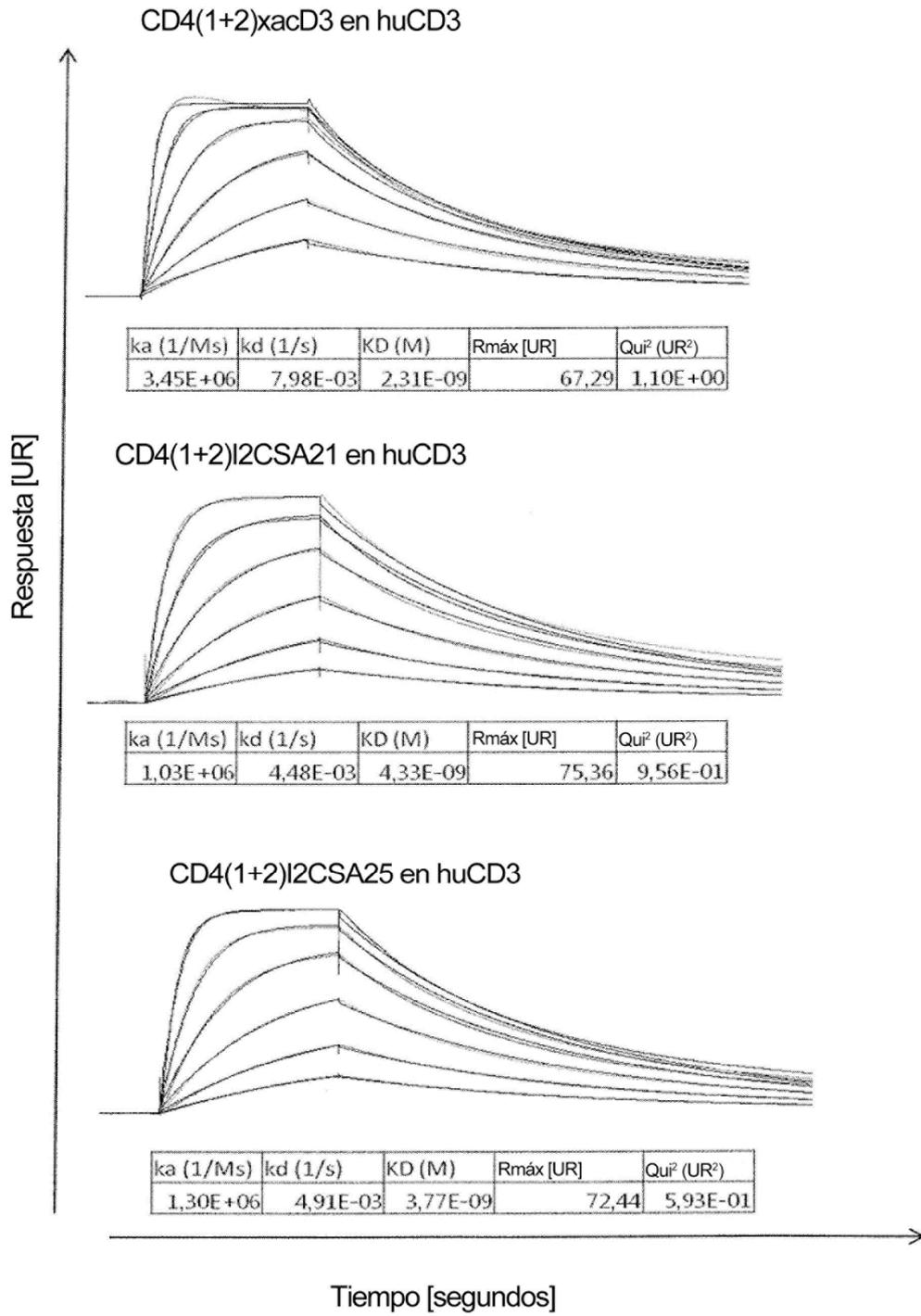


Figura 8

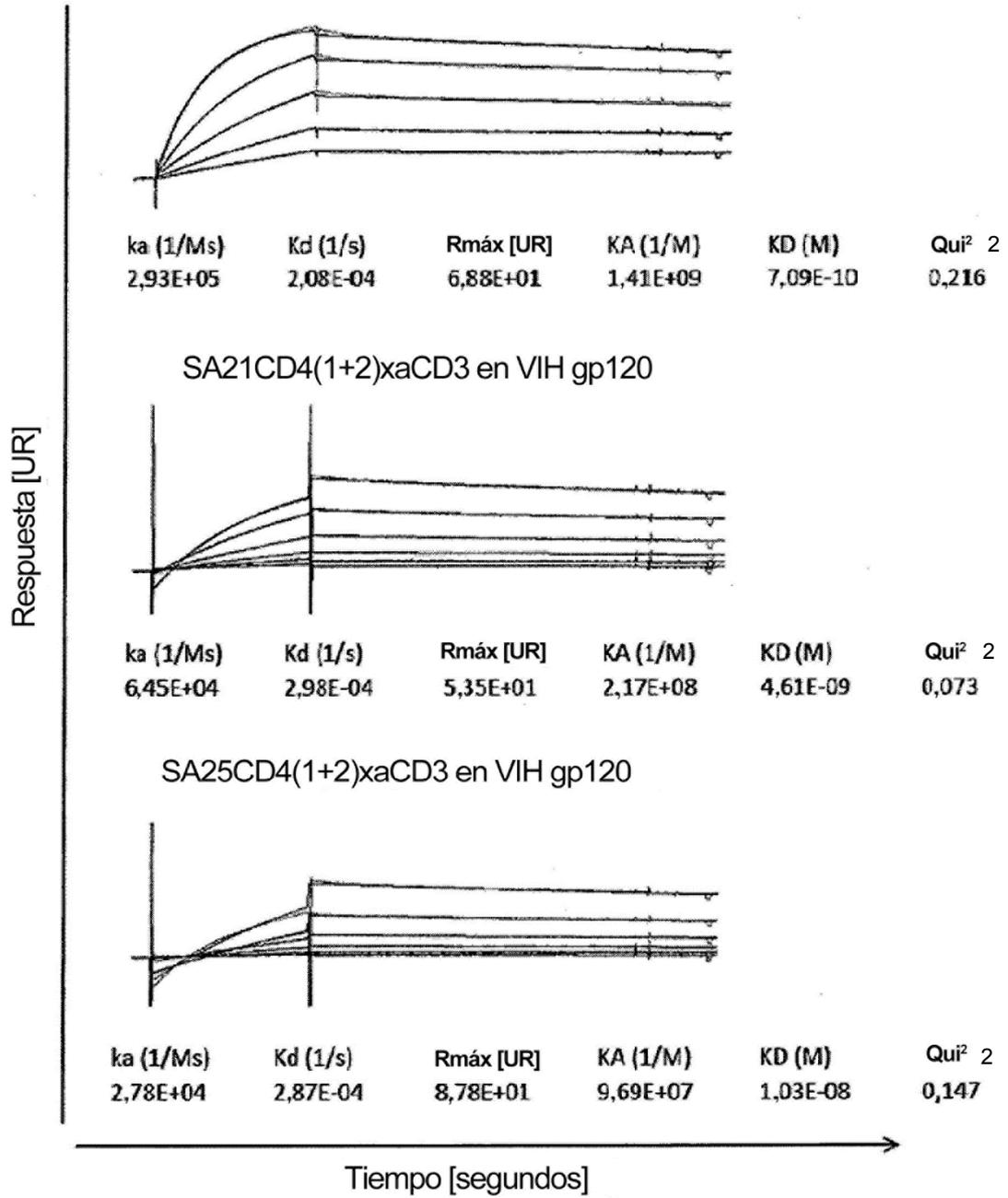


Figura 9

