

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 470**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13815506 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2935336**

54 Título: **Anticuerpos de Fab-Fv de conector único y métodos para producirlos**

30 Prioridad:

21.12.2012 GB 201223276

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

14.11.2018

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
60, Allée de la Recherche
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**DAVE, EMMA;
HEYWOOD, SAM PHILIP y
HUMPHREYS, DAVID PAUL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 689 470 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de Fab-Fv de conector único y métodos para producirlos

La presente descripción se refiere a ciertas construcciones multiespecíficas, a formulaciones farmacéuticas que comprenden la construcción, a ADN que codifica las construcciones y a vectores que las comprenden. La descripción también se extiende a un método para expresar las construcciones, por ejemplo, en una célula hospedante, y a métodos para formularlas como una composición farmacéutica. La descripción también se refiere al uso de las construcciones y las formulaciones en tratamientos.

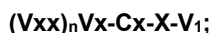
El documento WO2011/036460 describe anticuerpos multivalentes estabilizados con disulfuro. Lu D *et al.*, Journal of Immunological Methods, vol. 267, n.º 2, 15 de septiembre de 2002, pp. 213-226, describe la proteína de fusión de Fab-scFv.

Los documentos WO2009/040562 y WO2010/035012 describen ciertas moléculas biespecíficas útiles como agentes terapéuticos, conocidas como Fab-Fv o Fab-dsFv, respectivamente. Las moléculas de este tipo tienen una buena afinidad de unión por los antígenos para los cuales son específicas, y en el formato no se produce una oclusión significativa de los sitios de unión al antígeno. Aunque un alto porcentaje de estas moléculas de anticuerpo se expresan como un monómero funcional, existe una proporción que se agrega y de la que hay que purificar el monómero.

Los presentes inventores han vuelto a modificar las moléculas implicadas para proporcionar moléculas con una funcionalidad equivalente, al mismo tiempo que se minimiza la agregación en el estadio de expresión y, así, se aumenta sustancialmente el rendimiento del monómero.

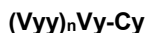
En un aspecto, se proporciona una molécula de anticuerpo multiespecífico que consiste en tres polipéptidos:

a) una cadena polipeptídica de fórmula (I):



y

b) una cadena polipeptídica de fórmula (II):



c) un polipéptido de fórmula (III):



en las que:

Vx representa un dominio variable,

Vxx representa un dominio variable,

Cx representa CH₁ o C_L,

X representa un conector,

V₁ representa un dominio variable,

Vy representa un dominio variable,

Vyy representa un dominio variable,

Cy representa CH₁ o C_L,

V₂ representa un dominio variable,

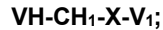
n representa independientemente 0 o 1,

en la que la cadena polipeptídica de fórmula (I) y la cadena polipeptídica de fórmula (II) están alineadas, de modo que las regiones constantes Cx y Cy están apareadas y solo una de Cx o Cy es CH₁, los dominios variables Vx y Vy están apareados para formar un dominio de unión, y un enlace disulfuro está presente entre V₁ y V₂.

En una realización, Vxx y Vyy también están apareados para formar un dominio de unión.

En un aspecto, se proporciona una molécula de anticuerpo biespecífico que consiste en tres polipéptidos:

a) una cadena pesada de fórmula (Ia):



y

b) una cadena ligera de fórmula (IIa):

5



c) un polipéptido de fórmula (III):



en las que:

VH representa un dominio variable de cadena pesada,

10 CH₁ representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada,

X representa un conector,

V₁ representa un dominio variable,

V_L representa un dominio variable de cadena ligera,

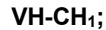
C_L representa una región constante procedente de una cadena ligera,

15 V₂ representa un dominio variable,

en la que está presente un enlace disulfuro entre V₁ y V₂.

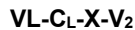
En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo biespecífico que consiste en tres polipéptidos:

a) una cadena pesada de fórmula (Ib):



20 y

b) una cadena ligera de fórmula (IIb):



c) un polipéptido de fórmula (III):



25 en las que:

VH representa un dominio variable de cadena pesada,

CH₁ representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada,

X representa un conector,

V₁ representa un dominio variable,

30 V_L representa un dominio variable de cadena ligera,

C_L representa una región constante procedente de una cadena ligera,

V₂ representa un dominio variable,

en la que está presente un enlace disulfuro entre V₁ y V₂.

35 De forma ventajosa, la presente construcción minimiza la cantidad de agregación observada durante la expresión y maximiza la cantidad de monómero obtenida, por ejemplo, el monómero puede ser 50%, 60%, 70% o 75% o más, tal como 80 o 90% o más de la proteína expresada.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra diversas secuencias para construcciones de Fab-Fv de conector único según la invención y para las construcciones comparativas FabdsScFv y FabdsFv

La figura 2 muestra un análisis de SDS-PAGE de las diversas construcciones.

5 La figura 3 muestra un análisis de exclusión molecular de las diversas construcciones.

La figura 4 muestra una representación esquemática de diversos ejemplos de construcciones según la descripción.

La figura 5 muestra la expresión transitoria de Fab-dsFv de conector único expresados a partir de plásmidos de triple gen en células CHO.

10 La figura 6 muestra un análisis de SDS-PAGE de diversos Fab-dsFv de conector único expresados a partir de plásmidos de triple gen.

La figura 7 muestra un análisis de exclusión molecular de Fab-dsFv de conector único expresados a partir de plásmidos de triple gen.

Descripción detallada de la invención

15 Un anticuerpo multiespecífico, tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula de anticuerpo según se describe en la presente que tiene dos o más dominios de unión, por ejemplo, dos o tres dominios de unión. En una realización, la construcción es un anticuerpo trispecífico. Una molécula trispecífica, tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula con tres dominios de unión al antígeno, que pueden unirse independientemente al mismo antígeno o a antígenos diferentes.

20 En una realización, la construcción es un anticuerpo biespecífico. Una molécula biespecífica, tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula con dos dominios de unión al antígeno, que pueden unirse al mismo antígeno o a antígenos diferentes.

En una realización, todos los dominios se unen al mismo antígeno, lo cual incluye la unión al mismo epitopo sobre el antígeno o la unión a diferentes epitopos sobre el antígeno.

25 En una realización, existen tres dominios de unión y cada uno de los tres dominios de unión se une a antígenos diferentes (diferenciados).

En una realización, existen tres dominios de unión y dos de los dominios de unión se unen al mismo antígeno, lo cual incluye la unión al mismo epitopo o a diferentes epitopos sobre el mismo antígeno, y el tercer dominio de unión se une a un antígeno diferente (diferenciado).

30 En una realización, la presente descripción se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende o que consiste en tres cadenas polipeptídicas.

Las moléculas multiespecíficas según la presente descripción se proporcionan como un dímero de una cadena pesada y ligera de:

fórmulas (I) y (II), respectivamente, en las que la porción Vx-Cx, junto con la porción Vy-Cy, forma un fragmento Fab o Fab' funcional, o como alternativa

35 fórmulas (Ia) y (IIa), en las que la porción VH-CH₁, junto con la porción VL-CL, forma un fragmento Fab o Fab' funcional.

En una realización, la construcción de la presente invención solo tiene dos sitios de unión al antígeno.

40 Un sitio de unión al antígeno, tal como se emplea en la presente, se refiere a una porción de la molécula que comprende una pareja de regiones variables, en particular una pareja cognada, que interactúan específicamente con el antígeno diana.

Específicamente, tal como se emplea en la presente, significa un sitio de unión que solo reconoce el antígeno para el cual es específico, o un sitio de unión que presenta una afinidad de unión significativamente mayor por el antígeno para el cual es específico comparado con la afinidad por antígenos para los cuales no es específico, por ejemplo, una afinidad de unión 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor.

45 La afinidad de unión puede medirse por medio de un ensayo convencional, por ejemplo, una resonancia de plasmón de superficie, tal como BIAcore.

En una realización, están presentes uno o más enlaces disulfuro intercatenarios (es decir, entre la cadena ligera y pesada) naturales o modificados en el fragmento Fab o Fab' funcional.

En una realización, está presente un enlace disulfuro "natural" entre un CH₁ y C_L o los correspondientes componentes C_x y C_y en las cadenas polipeptídicas de fórmulas (I) y (II). Las referencias que aparecen a continuación a CH₁ pueden aplicarse igualmente a C_x. Las referencias que aparecen a continuación a C_L pueden aplicarse igualmente a C_y.

- 5 Cuando el dominio C_L se deriva de kappa o lambda, la posición natural para una cisteína formadora de enlace es 214 en cKappa y cLambda humanos (numeración de Kabat, 4ª edición, 1987).

La localización exacta de la cisteína formadora de un enlace disulfuro en CH₁ depende del dominio concreto que se esté empleando. Así, por ejemplo, en gamma-1 humano, la posición natural del enlace disulfuro está localizada en la posición 233 (numeración de Kabat, 4ª edición, 1987). Se conoce la posición de la cisteína formadora de enlace en otros isotipos humanos, tales como gamma 2, 3, 4, IgM e IgD, por ejemplo, la posición 127 para IgM, IgE, IgG2, IgG3 e IgG4 e humanas, y 128 de la cadena pesada de IgD e IgA2B humanas.

Puede estar presente un enlace o enlaces disulfuro en la región constante de la molécula, además del enlace disulfuro entre una pareja de dominios variables V₁ y V₂.

- 15 En una realización, el anticuerpo multiespecífico según la descripción presenta un enlace disulfuro en una posición equivalente o correspondiente a la que aparece en la naturaleza entre CH₁ y C_L.

En una realización, una región constante que comprende CH₁ y una región constante, tal como C_L, presenta un enlace disulfuro que está en una posición no natural. Este puede formarse en la molécula introduciendo una o más cisteínas en la cadena de aminoácidos en la posición o posiciones requeridas. Este enlace disulfuro no natural está presente además o como alternativa al enlace disulfuro natural presente entre CH₁ y C_L.

20 La introducción de las cisteínas modificadas puede realizarse empleando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a una mutagénesis de solapamiento por extensión con PCR, una mutagénesis específica dirigida a sitio, o una mutagénesis de módulos (véase, en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). En el mercado están disponibles kits de mutagénesis específica dirigida a sitio, por ejemplo, el kit de mutagénesis específica dirigida a sitio QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA). La mutagénesis de módulos puede realizarse basándose en Wells *et al.*, 1985, Gene, 34:315-323. Como alternativa, pueden prepararse mutantes por medio de síntesis de genes totales mediante reasociación, acoplamiento y amplificación con PCR y clonación de los oligonucleótidos solapantes.

- 30 En una realización, un enlace disulfuro entre CH₁ y C_L está completamente ausente, por ejemplo, las cisteínas intercatenarias pueden ser reemplazadas por otro aminoácido, tal como serina. Por tanto, no existen enlaces disulfuro intercatenarios en el fragmento Fab funcional de la molécula. Descripciones, tales como el documento WO2005/003170, describen la forma de proporcionar fragmentos Fab sin un enlace disulfuro intercatenario.

En una realización, n es 1 en la cadena polipeptídica de fórmula (I).

- 35 En una realización, n es 1 en la cadena polipeptídica de fórmula (II).

En una realización, n es 1 en la cadena polipeptídica de fórmulas (I) y (II).

En una realización, n es 0 en la cadena polipeptídica de fórmulas (I) y (II).

40 V_{xx} puede derivarse de una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera o una combinación de ambas, y puede comprender un conector de aminoácidos de 1 a 20 aminoácidos, por ejemplo, como se describe a continuación. En una realización, V_{xx} consiste en una región variable, en particular una región variable derivada de una cadena pesada. En una realización, V_{xx} representa un dominio variable de cadena ligera. En una realización, V_{xx} es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, V_{xx} está humanizado.

45 V_x puede derivarse de una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera o una combinación de ambas, en particular una región variable derivada de una cadena pesada. En una realización, V_x representa un dominio variable de cadena ligera. En una realización, V_x es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, V_x está humanizado.

V_x en los polipéptidos de fórmula (I) se corresponde con V_H en la cadena polipeptídica (Ia).

- 50 V_H representa un dominio variable, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada. En una realización, V_H representa un dominio variable de cadena pesada. En una realización, V_H es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, V_H está humanizado.

- 5 V_1 representa un dominio variable, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada o de cadena ligera. En una realización, V_1 representa un dominio variable de cadena pesada. En una realización, V_1 representa un dominio variable de cadena ligera. En una realización, V_1 es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, V_1 está humanizado.
- 10 Vyy puede derivarse de una cadena pesada, una cadena ligera o una combinación de ambas, y puede comprender un conector de aminoácidos de 1 a 20 aminoácidos, por ejemplo, como se describe a continuación. En una realización, Vyy consiste en una región variable, en particular una región variable derivada de una cadena ligera. En una realización, Vyy representa un dominio variable de cadena pesada. En una realización, Vyy es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, Vyy está humanizado.
- 15 Vy puede derivarse de una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera o una combinación de ambas, en particular una región variable derivada de una cadena ligera. En una realización, Vy representa un dominio variable de cadena pesada. En una realización, Vy es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, Vy está humanizado.
- Vy en los polipéptidos de fórmula (II) se corresponde con VL en la cadena polipeptídica (IIa).
- 20 V_L representa un dominio variable, por ejemplo, un dominio variable de cadena ligera. En una realización, V_L representa un dominio variable de cadena ligera. En una realización, V_L es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, V_L está humanizado.
- 25 V_2 representa un dominio variable, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada o de cadena ligera. En una realización, V_2 representa un dominio variable de cadena ligera. En una realización, V_2 representa un dominio variable de cadena pesada. En una realización, V_2 es un dominio variable quimérico, es decir, comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo, un marco humano y CDR no humanas. En una realización, V_1 está humanizado.
- En general, Vxx y Vyy forman conjuntamente un dominio de unión al antígeno. En una realización, Vxx y Vyy conjuntamente representan una pareja cognada.
- 30 En general, Vx y Vy forman conjuntamente un dominio de unión al antígeno. En una realización, Vx y Vy conjuntamente representan una pareja cognada.
- En una realización, el dominio de unión formado por VH y VL es específico para un primer antígeno.
- En una realización, VH y VL forman una pareja cognada.
- En general, V_1 y V_2 forman conjuntamente un dominio de unión al antígeno. En una realización, V_1 y V_2 conjuntamente representan una pareja cognada.
- 35 En una realización, V_1 y V_2 conjuntamente forman un dominio de unión al antígeno específico para un primer antígeno (es decir, los dos dominios de unión en la molécula pueden ser específicos para el mismo antígeno, por ejemplo, se unen al mismo epitopo o a epitopos diferentes sobre él).
- En una realización, V_1 y V_2 conjuntamente son un dominio de unión para la albúmina de suero humana.
- 40 En una realización, V_1 y V_2 conjuntamente forman un dominio de unión al antígeno específico para un segundo antígeno (es decir, los dos dominios de unión en la molécula son específicos de diferentes antígenos).
- En una realización, el enlace disulfuro entre V_1 y V_2 se produce entre dos de los restos listados a continuación (a menos que el contexto indique lo contrario; en la siguiente lista se emplea la numeración de Kabat). Cuando se menciona la numeración de Kabat, la referencia pertinente es Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE. UU. En una realización, el enlace disulfuro está en una posición seleccionada del grupo que comprende:
- 45
- VH37 + VL95C, véase, por ejemplo, Protein Science, 6, 781-788, Zhu *et al.* (1997);
 - VH44 + VL100, véase, por ejemplo, Biochemistry, 33, 5451-5459, Reiter *et al.* (1994); o Journal of Biological Chemistry vol. 269, n.º 28, pp.18327-18331, Reiter *et al.* (1994); o Protein Engineering, vol.10, n.º 12, pp.1453-1459, Rajagopal *et al.* (1997);
- 50
- VH44 + VL105, véase, por ejemplo, J. Biochem., 118, 825-831, Luo *et al.* (1995);
 - VH45 + VL87, véase, por ejemplo, Protein Science, 6, 781-788, Zhu *et al.* (1997);

- VH55 + VL101, véase, por ejemplo, FEBS Letters, 377, 135-139, Young *et al.* (1995);
- VH100 + VL50, véase, por ejemplo, Biochemistry, 29, 1362-1367, Glockshuber *et al.* (1990);
- VH100b + VL49;
- VH98 + VL46, véase, por ejemplo, Protein Science, 6, 781-788, Zhu *et al.* (1997);

5 • VH101 + VL46;

• VH105 + VL43, véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., vol. 90, pp.7538-7542, Brinkmann *et al.* (1993); o Proteins, 19, 35-47, Jung *et al.* (1994);

• VH106 + VL57, véase, por ejemplo, FEBS Letters, 377, 135-139, Young *et al.* (1995)

y una posición correspondiente en la pareja de la región variable localizada en la molécula.

10 Las parejas de aminoácidos listadas anteriormente están en posiciones que conducen al reemplazo por cisteínas, de modo que pueden formarse enlaces disulfuro. Las cisteínas pueden introducirse en estas posiciones deseadas mediante técnicas conocidas. Por tanto, en una realización, una cisteína modificada según la presente invención se refiere al caso en el que el resto natural en una posición de aminoácido concreta ha sido reemplazado por un resto cisteína.

15 La introducción de cisteínas modificadas puede realizarse empleando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a una mutagénesis de solapamiento por extensión con PCR, una mutagénesis específica dirigida a sitio, o una mutagénesis de módulos (véase, en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). En el
20 mercado están disponibles kits de mutagénesis específica dirigida a sitio, por ejemplo, el kit de mutagénesis específica dirigida a sitio QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA). La mutagénesis de módulos puede realizarse basándose en Wells *et al.*, 1985, Gene, 34:315-323. Como alternativa, pueden prepararse mutantes por medio de síntesis de genes totales mediante reasociación, acoplamiento y amplificación con PCR y clonación de los oligonucleótidos solapantes.

25 Por consiguiente, en una realización, una pareja de regiones variables (V_1/V_2) de la presente invención pueden estar unidas por un enlace disulfuro entre dos restos cisteína, uno en V_1 y uno en V_2 , en la que la posición de la pareja de restos cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43, y VH106 y VL57.

30 En una realización, una pareja de regiones variables (V_1/V_2) de la presente invención pueden estar unidas por un enlace disulfuro entre dos restos cisteína, uno en V_1 y uno en V_2 , que están fuera de las CDR, en la que la posición de la pareja de restos cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43, y VH106 y VL57.

35 En una realización, V_1 es un dominio variable de cadena pesada y V_2 es un dominio variable de cadena ligera, y V_1 y V_2 están unidos mediante un enlace disulfuro entre dos restos cisteína modificados, uno en la posición VH44 de V_1 y el otro en VL100 de V_2 .

En una realización, VH y V_1 son regiones variables que proceden ambas de una o más cadenas pesadas o una o más cadenas ligeras, en particular ambas se derivan de dos regiones variables de cadena pesada distintas.

En una realización, VL y V_2 son regiones variables que proceden ambas de una o más cadenas pesadas o una o más cadenas ligeras, en particular ambas se derivan de dos regiones variables de cadena ligera distintas.

40 Una pareja cognada, tal como se emplea en la presente, se refiere a una pareja de dominios variables procedentes de un único anticuerpo que se generan *in vivo*, es decir, el apareamiento natural de los dominios variables aislados de un hospedante. Por tanto, una pareja cognada es una pareja de VH y VL. En un ejemplo, la pareja cognada se une al antígeno de modo cooperativo.

45 Una región variable, tal como se emplea en la presente, se refiere a la región en una cadena de anticuerpo que comprende las CDR y un marco adecuado.

Las regiones variables para su uso en la presente descripción en general se derivan de un anticuerpo, que puede generarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

50 Derivado o procedente, tal como se emplea en la presente, se refiere al hecho de que la secuencia empleada o una secuencia muy similar a la secuencia empleada se obtiene a partir del material genético original, tal como la cadena ligera o pesada de un anticuerpo.

Muy similar, tal como se emplea en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos que, a lo largo de su longitud completa, es 95% similar o más, tal como 96, 97, 98 o 99% similar.

Pueden obtenerse anticuerpos generados contra un polipéptido de antígeno, para lo cual es necesario inmunizar a un animal administrando polipéptidos al animal, preferiblemente un animal no humano, empleando protocolos muy conocidos y habituales; véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido, 1986). Pueden inmunizarse muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos. Sin embargo, son más adecuados ratones, conejos, cerdos y ratas.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica del hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica del hibridoma-EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

También pueden generarse anticuerpos empleando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales, mediante la clonación y la expresión de ADNc de regiones variables de inmunoglobulinas generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante los métodos descritos en Babcook, J., *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(15):7843-78481; documento WO92/02551; documento WO2004/051268 y documento WO2004/106377.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención también pueden generarse empleando diversos métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman *et al.* (en J. Immunol. Methods, 1995, 182:41-50), Ames *et al.* (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic *et al.* (Gene, 1997, 187, 9-18), Burton *et al.* (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) y los documentos WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; y los documentos US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; 5.969.108, y el documento WO2001/30305.

En una realización, las moléculas biespecíficas según la descripción están humanizadas.

Humanizado (que incluyen anticuerpos con injertos de CDR), tal como se emplea en la presente, se refiere a moléculas que poseen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) procedentes de una especie no humana, y una región de marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089; documento WO91/09967). Se apreciará que tan solo puede ser necesario transferir los restos determinantes de la especificidad de las CDR en lugar de la CDR completa (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender además opcionalmente uno o más restos de marco derivados de la especie no humana de la cual se derivan las CDR.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "molécula de anticuerpo humanizada" se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (que incluyen, si se desea, una o más CDR modificadas) procedentes de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertadas en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para un análisis, véase Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una realización, en lugar de transferir la CDR completa, solo se transfieren uno o más de los restos determinantes de la especificidad de cualquiera de las CDR descritas anteriormente en la presente al marco del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). En una realización, solo se transfieren los restos determinantes de la especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente en la presente al marco del anticuerpo humano. En otra realización, solo se transfieren los restos determinantes de la especificidad procedentes de cada una de las CDR descritas anteriormente en la presente al marco del anticuerpo humano.

Cuando las CDR o los restos determinantes de la especificidad se injertan, puede emplearse cualquier secuencia de marco de región variable aceptor apropiada, teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante del cual se derivan las CDR, que incluyen regiones marco de ratón, de primate y humanas. De modo adecuado, el anticuerpo humanizado según la presente invención presenta un dominio variable que comprende regiones de marco aceptoras humanas, así como una o más de las CDR proporcionadas en la presente.

Los ejemplos de marcos humanos que pueden utilizarse en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, supra). Por ejemplo, pueden usarse KOL y NEWM para la cadena pesada, puede usarse REI para la cadena ligera, y pueden usarse EU, LAY y POM para ambas cadena pesada y cadena ligera. Como alternativa, pueden emplearse secuencias de línea germinal humana; estas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, no es necesario que las cadenas pesada y ligera del aceptor se deriven del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que presentan regiones de marco derivadas de diferentes cadenas.

No es necesario que las regiones de marco tengan exactamente la misma secuencia que la del anticuerpo aceptor.

5 Por ejemplo, los restos poco habituales pueden cambiarse por restos que aparecen con más frecuencia en esa clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, pueden cambiarse restos seleccionados en las regiones de marco aceptor para que se correspondan con el resto que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann *et al.*, 1998, Nature, 332, 323-324). Estos cambios deben mantenerse al nivel mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Se indica un protocolo para seleccionar restos en las regiones de marco aceptor que puede que sea necesario cambiar en el documento WO91/09967.

En una realización, los anticuerpos biespecíficos de la presente descripción son totalmente humanos, en particular uno o más de los dominios variables son totalmente humanos.

10 Las moléculas totalmente humanas son aquellas en las que las regiones variables y las regiones constantes (si están presentes) de las cadenas pesada y ligera son todas de origen humano, o son sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente procedentes del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos totalmente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los métodos de presentación de fagos descritos anteriormente, y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la región variable de una inmunoglobulina murina y, opcionalmente, de la región constante, han sido reemplazados por sus homólogos humanos, por ejemplo, como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 B1, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US5.770.429, EP 0438474 y EP0463151.

Cx es un dominio constante procedente de una cadena ligera o pesada, en particular una cadena pesada.

Cx en el polipéptido de fórmula (I) se corresponde con CH₁ en los polipéptidos de fórmula (Ia). En una realización, Cx es equivalente a CH₁.

20 En una realización, el dominio CH₁ es un dominio 1 natural procedente de una cadena pesada o uno de sus derivados. En una realización, el fragmento CH consiste en un dominio CH₁.

Cy es un dominio constante procedente de una cadena ligera o pesada, en particular una cadena ligera.

Cy en el polipéptido de fórmula (II) se corresponde con CL en los polipéptidos de fórmula (IIa). En una realización, Cy es equivalente a CL.

25 En una realización, el fragmento C_L en la cadena ligera es una secuencia kappa constante o una secuencia lambda constante o uno de sus derivados.

30 Un derivado de un dominio natural, tal como se emplea en la presente, se refiere al caso en que uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia natural han sido reemplazados o delecionados, por ejemplo, para optimizar las propiedades del dominio, tal como eliminando propiedades no deseables, pero conservando la característica o características definitorias del dominio.

En una realización, X es un conector, por ejemplo, un péptido adecuado para conectar las porciones CH₁ y V₁.

En una realización, X es un conector, por ejemplo, un péptido adecuado para conectar las porciones C_L y V₂.

En una realización, el conector peptídico tiene una longitud de 50 aminoácidos o menor, por ejemplo, 20 aminoácidos o menor.

35 En una realización, el conector se selecciona de una secuencia mostrada en las secuencias 13 a 77.

En una realización, el conector se selecciona de una secuencia mostrada en SEQ ID NO:103 o SEQ ID NO:104.

Tabla 1 - Secuencias de conectores de bisagra

SEQ ID NO:	SECUENCIA
13	DKTHTCAA
14	DKTHTCPPCPA
15	DKTHTCPPCPATCPPCPA
16	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
17	DKTHTCPPCP AGKPTL YNSL VMSDT AGTCY
18	DKTHTCPPCP AGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
19	DKHTCCVECPCPA

ES 2 689 470 T3

20	DKHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
21	DKHTCPSCPA

Tabla 2 - Secuencias de conectores flexibles

SEQ ID NO:	SECUENCIA
22	SGGGGSE
23	DKHTS
24	(S)GGGGS
25	(S)GGGGSGGGGS
26	(S)GGGGSGGGGSGGGGS
27	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
28	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
29	AAAGSG-GASAS
30	AAAGSG-XGGGS-GASAS
31	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
32	AAAGSG-XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
33	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
34	AAAGSG-XS-GASAS
35	PGGNRGT T T T R R P A T T T G S S P G P T Q S H Y
36	A T T T G S S P G P T
37	A T T T G S
-	GS
38	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
39	GTVAAPSVFIFPPSD
40	GGGGIAPSMVGGGGS
41	GGGGKVEGAGGGGGS
42	GGGGSMKSHDGGGGS
43	GGGGNLITIVGGGGS
44	GGGGVPSLPGGGGS
45	GGEKSIPGGGGS
46	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
47	YPRSIYIRRRHPSPLTT
48	TPSHLSHILPSFGLPTFN
49	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
50	SPA AH F P R S I P R P G P I R T

ES 2 689 470 T3

51	APGPSAPSHRSLPSRAFG
52	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
53	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
54	SPQYPSPLTLTPPHPSL
55	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
56	LPWRTSLLPSLPLRRRP
57	PPLFAKGPV GLLSRSFPP
58	VPPAPVVSLRSAHARPPY
59	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
60	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
61	CNPLLPLCARSPAVRTFP
(S) es opcional en las secuencias 24 a 28.	

Los ejemplos de conectores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO:62), PPPP (SEQ ID NO:63) y PPP.

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

- 5 Se proporcionan ejemplos de péptidos de unión a albúmina en el documento WO2007/106120 e incluyen:

Tabla 3

SEQ ID NO:	SECUENCIA
64	DLCLRDWGCLW
65	DICLPRWGCLW
66	MEDICLPRWGCLWGD
67	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
68	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
69	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
70	EDICLPRWGCLWEDD
71	RLMEDICLPRWGCLWEDD
72	MEDICLPRWGCLWEDD
73	MEDICLPRWGCLWED
74	RLMEDICLARWGCLWEDD
75	EVRSFCTRWP AEKSCKPLRG
76	RAPEFVCYWETICFERSEQ
77	EMCYFPGICWM

De modo ventajoso, el uso de péptidos de unión a albúmina como conectores puede aumentar la semivida de la molécula de anticuerpo biespecífica.

- 10 Para evitar dudas, V₂ aún está presente en la molécula de anticuerpo y se mantiene allí en virtud del apareamiento

con V₁, que incluye cuando un enlace disulfuro está presente entre V₁ y V₂.

En una realización, las moléculas de anticuerpos biespecíficos de la descripción son capaces de unirse selectivamente a dos antígenos de interés diferentes.

5 En una realización, un antígeno de interés al cual se unen V_{xx}/V_{yy}, V_x/V_y, V_H/V_L y V₁/V₂ se selecciona independientemente de una proteína asociada a células, por ejemplo, una proteína de la superficie celular sobre células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, y una proteína soluble.

10 Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína de importancia médica, tales como las proteínas sobrerreguladas durante una enfermedad o una infección, por ejemplo, receptores y/o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos concretos de proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas, tales como β1 integrinas, por ejemplo, VLA-4, E-selectina, P-selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, DPCR1, DPCR1, dudulina2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, similar a nectina 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de la grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC de clase I y de MHC de clase II, y VEGF, y, cuando sea apropiado, sus receptores.

15

20 Los antígenos solubles incluyen interleuquinas, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, IL-23, antígeno víricos, por ejemplo, del virus sincitial respiratorio o antígenos de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones, tales como interferón α, interferón β o interferón γ, factor de necrosis tumoral-α, factor de necrosis tumoral-β, factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas, tales como PDGF-α y PDGF-β, y, cuando sea apropiado, sus receptores. Otros antígenos incluyen antígenos de la superficie de células bacterianas, toxinas bacterianas, virus, tales como virus de la gripe, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionúclidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

25

En una realización, la proteína de fusión de anticuerpo de la invención puede emplearse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, de modo directo o indirecto.

30 En una realización, el antígeno de interés que se une a V_H y V_L es OX40. En una realización, la porción de V_x-C_x o V_HCH1 del anticuerpo multiespecífico tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:3. En una realización, la porción de V_y-C_y o V_L-CL del anticuerpo multiespecífico tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:7.

En una realización, un antígeno de interés que se une a V_H/V_L o V₁/V₂ proporciona la capacidad de reclutar funciones efectoras, tales como la activación de la vía del complemento y/o el reclutamiento de células efectoras.

35 El reclutamiento de una función efectora puede ser directo, en el sentido de que la función efectora está asociada con una célula y dicha célula porta una molécula de reclutamiento sobre su superficie. Puede producirse un reclutamiento indirecto cuando la unión de un dominio de unión (tal como V₁/V₂) en la molécula según la presente descripción con un polipéptido de reclutamiento provoca la liberación, por ejemplo, de un factor que, a su vez, puede reclutar directa o indirectamente una función efectora, o puede realizarse mediante la activación de una vía de señalización. Los ejemplos incluyen TNFα, IL2, IL6, IL8, IL17, IFNγ, histamina, C1q, opsonina y otros miembros de las cascadas de activación del complemento clásicas y alternativas, tales como C2, C4, C3-convertasa, y de C5 a C9.

40

45 Tal como se emplea en la presente, un "polipéptido de reclutamiento" incluye un FcγR, tal como FcγRI, FcγRII y FcγRIII, una proteína de la vía del complemento tal como, pero sin limitarse a C1q y C3, una proteína marcadora de CD (marcadora del agrupamiento de diferenciación, "Cluster of Differentiation") tal como, pero sin limitarse a CD68, CD115, CD16, CD80, CD83, CD86, CD56, CD64, CD3, CD4, CD8, CD28, CD45, CD19, CD20 y CD22. Otros polipéptidos de reclutamiento que son proteínas marcadoras de CD incluyen CD1, CD1d, CD2, CD5, CD8, CD9, CD10, CD11, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD40, CD43, CD44, CD45, CD46, CD49, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD61, CD62, D62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD66e, CD68, CD70, CD71, CD72, CD79, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD88, CD89, CD90, CD94, CD95, CD98, CD106, CD114, CD116, CD117, CD118, CD120, CD122, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD137, CD138, CD141, CD142, CD143, CD146, CD147, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD162, CD164, CD169, CD184, CD206, CD209, CD257, CD278, CD281, CD282, CD283 y CD304, o cualquiera de sus fragmentos que conserven la capacidad para reclutar una función efectora mediada por células de modo directo o indirecto. Un polipéptido de reclutamiento también incluye moléculas de inmunoglobulina, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE e IgA que poseen una función efectora.

50

55

En una realización, un dominio de unión (tal como V₁/V₂) en la molécula según la presente descripción tiene especificidad por una proteína de la vía del complemento, siendo C1q particularmente preferida.

Además, las moléculas de la presente invención pueden utilizarse para quelar radionúclidos en virtud de un anticuerpo de dominio único que se une a una proteína quelante de núclidos. Estas proteínas de fusión se emplean en la formación de imágenes o en estrategias de transporte dirigido de radionúclidos para terapias.

5 En una realización, un dominio de unión en una molécula según la descripción (tal como V₁/V₂) tiene especificidad por una proteína marcadora de CD, siendo CD68, CD80, CD86, CD64, CD3, CD4, CD8 CD45, CD16 y CD35 particularmente preferidas.

10 En una realización, un dominio de unión en una molécula según la descripción (tal como V₁/V₂) tiene especificidad por una proteína portadora sérica, una molécula de inmunoglobulina en la circulación o CD35/CR1, por ejemplo, para proporcionar una semivida prolongada al fragmento de anticuerpo con especificidad por dicho antígeno de interés mediante la unión a dicha proteína portadora sérica, molécula de inmunoglobulina en la circulación o CD35/CR1.

Tal como se emplea en la presente, las "proteínas portadoras séricas" incluyen la proteína de unión a tiroxina, la transtiretina, la α1-glicoproteína ácida, la transferrina, el fibrinógeno y la albúmina, o cualquiera de sus fragmentos.

15 Tal como se emplea en la presente, una "molécula de inmunoglobulina en la circulación" incluye IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sIgA, IgM e IgD, o cualquiera de sus fragmentos.

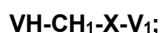
CD35/CR1 es una proteína presente en eritrocitos que tiene una semivida de 36 días (un intervalo normal de 28 a 47 días; Lanaro *et al.*, 1971, Cancer, 28(3):658-661).

20 En una realización, la proteína por la cual V₁/V₂ presenta especificidad es una proteína portadora sérica, tal como una proteína portadora sérica humana. En la realización más preferida, la proteína portadora sérica es la albúmina del suero humana.

En la figura 1 se describen regiones variables de unión a la albúmina y CDR en construcciones.

Así, en una realización se proporciona una molécula de anticuerpo biespecífico que consiste en tres polipéptidos:

a) una cadena pesada de fórmula (Ia):



25 y

b) una cadena ligera de fórmula (IIa):



c) un polipéptido de fórmula (III):



30 en las que:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada,

CH₁ representa el dominio 1 de una región constante de cadena pesada,

X representa un conector,

V₁ representa un dominio variable,

35 V_L representa un dominio variable de cadena ligera,

C_L representa una región constante procedente de una cadena ligera,

V₂ representa una región variable,

40 en la que V_H y V_L son una pareja cognada de regiones variables alineadas para formar un dominio de unión, y V₁ y V₂ son una pareja cognada de regiones variables alineadas para formar un dominio de unión, en la que existe un enlace disulfuro entre ellas, por ejemplo, en la que V₁ y V₂ son capaces de unirse a la albúmina *in vivo*, en particular a la albúmina del suero humana.

45 En una realización, V₁ o V₂ comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:83 y SEQ ID NO:86. En una realización, V₁ tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:4, y V₂ tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:8. En una realización, V₁ tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:86, y V₂ tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:83.

- 5 En un ejemplo, V_1 o V_2 , en particular V_1 , es un dominio VH que comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:87 para CDRH-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:88 para CDRH2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:89 para CDRH-3. En un ejemplo, V_1 o V_2 , en particular V_1 , es un dominio VH que comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:93 para CDRH-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:94 para CDRH2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:95 para CDRH-3.
- 10 En una realización, V_1 o V_2 , en particular V_2 , es un dominio VL que comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:90 para CDRL-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:91 para CDRL2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:92 para CDRL-3. En una realización, V_1 o V_2 , en particular V_2 , es un dominio VL que comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:96 para CDRL-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:97 para CDRL2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:98 para CDRL-3.
- En un ejemplo, V_1 o V_2 , en particular V_1 , es un dominio VH que comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 86, SEQ NO:99 o SEQ ID NO:100.
- 15 En un ejemplo, V_1 o V_2 , en particular V_2 , es un dominio VL que comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:83, SEQ NO:101 o SEQ ID NO:102.
- En un ejemplo, V_1 es un dominio VH que comprende la secuencia que aparece en SEQ NO:99, y V_2 es un dominio VL que comprende la secuencia que aparece en SEQ NO:101.
- En un ejemplo, V_1 es un dominio VH que comprende la secuencia que aparece en SEQ NO:100, y V_2 es un dominio VL que comprende la secuencia que aparece en SEQ NO:102.
- 20 En un ejemplo, el polipéptido Ia tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:6.
- En un ejemplo, el polipéptido IIa tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:7.
- En un ejemplo, el polipéptido Ib tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:3.
- En un ejemplo, el polipéptido IIb tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:5.
- En un ejemplo, el polipéptido Ia tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:6, el polipéptido IIa tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:7, y V_2 tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:8.
- 25 En un ejemplo, el polipéptido Ib tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:3, el polipéptido IIb tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:5, y V_1 tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:4.
- La invención también proporciona secuencias que son 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similares a una secuencia o anticuerpo descrito en la presente.
- 30 "Identidad", tal como se emplea en la presente, indica que en cualquier posición concreta en las secuencias alineadas, el resto aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", tal como se emplea en la presente, indica que en cualquier posición concreta en las secuencias alineadas, el resto aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo puede sustituirse entre sí incluyen, pero no se limitan a:
- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
 - 35 - lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
 - aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
 - asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
 - cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud pueden calcularse con facilidad (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el software BLAST™ disponible en NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410; Gish, W. y States, D.J., 1993, Nature Genet., 3:266-272; Madden, T.L., *et al.*, 1996, Meth. Enzymol., 266:131-141; Altschul, S.F., *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L., 1997, Genome Res., 7:649-656).
- 40 En un aspecto alternativo, la presente descripción proporciona un fragmento Fab o Fab' conectado a un scFv estabilizado con disulfuro, en el que el scFv estabilizado con disulfuro ("disulphide stabilised scFv", dsscFv) está conectado al C-terminal de la cadena pesada o ligera del fragmento Fab o Fab' directamente o a través de un conector descrito en la presente. Preferiblemente, la proteína de fusión de Fab-dsscFv es biespecífica. En un
- 50

ejemplo, el dsscFv se une a una proteína portadora sérica, tal como la albúmina del suero humana. En un ejemplo, el dsscFv está conectado al C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' a través del conector que aparece en SEQ ID NO:78. En un aspecto, el dsscFv está conectado al C-terminal de la cadena ligera del fragmento Fab o Fab' a través del conector que aparece en SEQ ID NO:103. En un ejemplo, la cadena pesada del Fab-dsscFv tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:9, y la cadena ligera tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:10. En un ejemplo, la cadena pesada del Fab-dsscFv tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:11, y la cadena ligera tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:12.

En una realización, las moléculas de anticuerpos biespecíficos de la presente descripción se procesan para proporcionar una afinidad mejorada por un antígeno o antígenos diana. Estas variantes pueden obtenerse mediante una serie de protocolos de maduración por afinidad, que incluyen mutar las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), el reordenamiento de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), el reordenamiento del ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), la presentación de fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y la PCR sexual (Cramer *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (supra) analiza estos métodos de maduración por afinidad.

Una afinidad mejorada, tal como se emplea en este contexto, se refiere a una mejora con respecto a la molécula de partida.

Si se desea, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas conectadas para formar un único resto que puede unirse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, este puede prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante o químicos convencionales, en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpos son muy conocidas en la técnica (véase, Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2ª ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, pp. 623-653; Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev., 62:119-158; y Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos concretos incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, el enlace puede lograrse empleando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

La expresión molécula efectora, tal como se emplea en la presente, incluye, por ejemplo, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros naturales o sintéticos, ácidos nucleicos y sus fragmentos, por ejemplo, ADN, ARN y sus fragmentos, radionúclidos, en particular radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados, tales como ¹¹¹In y ⁹⁰Y, Lu177, bismuto213, californio252, iridio192 y wolframio188/renio188; o fármacos, tales como, pero sin limitarse a alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a inmunoglobulinas, toxinas, tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina de la difteria, una proteína, tal como insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica, tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

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

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la

inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el transporte de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a la albúmina, tales como los descritos en el documento WO05/117984.

- 5 Cuando la molécula efectora es un polímero, este puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo- o heteropolisacárido.

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

- 10 Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol, poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o sus derivados, en especial polietilenglicol opcionalmente sustituido, tal como metoxipolietilenglicol, o sus derivados.

- 15 Los polímeros naturales concretos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o sus derivados. Los "derivados", tal como se emplean en la presente, incluyen los derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos con tiol selectivos, tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo, en algunos casos, formará parte del producto como el grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

- 20 El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo de 5000 Da a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, basándose en el uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad para posicionarse en ciertos tejidos, tales como tumores, o una mayor semivida en la circulación (para un análisis, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando el producto está previsto para que abandone la circulación y penetre en un tejido, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de un tumor, puede resultar ventajoso emplear un polímero de peso molecular bajo, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede resultar ventajoso emplear un polímero con un peso molecular más alto, por ejemplo, que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

- 30 Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como polietilenglicol, o, en especial, un metoxipolietilenglicol, o uno de sus derivados, y en especial con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

- 35 En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención están unidos a restos polietilenglicol (PEG). En un ejemplo concreto, el anticuerpo de la descripción es un fragmento de anticuerpo, y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o cadena lateral de un aminoácido disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Estos aminoácidos pueden aparecer de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden introducirse en el fragmento empleando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento US 5.219.996; documento US 5.667.425; documento WO98/25971; documento WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento Fab modificado, en el que la modificación es la adición de uno o más aminoácidos al extremo C-terminal de su cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora. De forma adecuada, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o más restos cisteína a los cuales puede unirse la molécula efectora. Pueden emplearse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

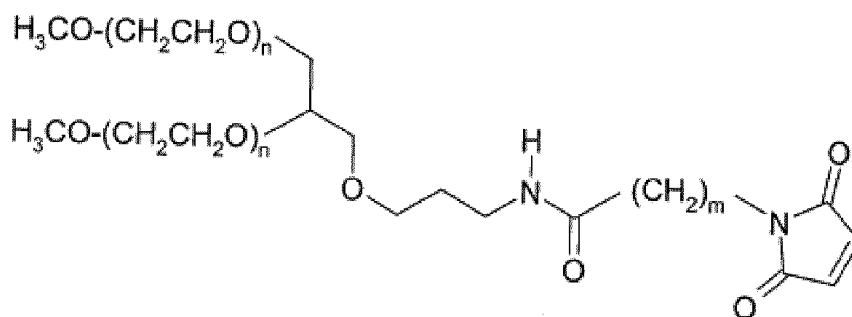
- 45 De forma adecuada, las moléculas de PEG se unen covalentemente a un grupo tiol de al menos un resto cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar unida covalentemente al átomo de azufre de un resto cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente será, en general, un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se emplea un grupo tiol como punto de unión, pueden emplearse moléculas efectoras activadas de modo apropiado, por ejemplo derivados selectivos para el tiol, tales como maleimidas y derivados de cisteína. Puede emplearse un polímero activado como material de partida para la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros, tal como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con el tiol, tal como un éster o ácido α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Estos materiales de partida pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, en Nektar, antes Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EEUU) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado empleando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG concretas incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que puede obtenerse en Nektar, antes Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (que puede obtenerse en Nektar, antes Shearwater).

En una realización, un Fab o Fab' en la molécula está PEGilado, es decir, tiene PEG (polietilenglicol) unido covalentemente a él, por ejemplo, según el método descrito en los documentos EP 0948544 o EP1090037 [véase

además "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds.), American Chemical Society, Washington D.C.; y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una cisteína en la región de bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG presenta un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región de bisagra modificada. Un resto lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida, y a cada uno de los grupos amina en el resto lisina puede unirse un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tenga un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40.000 Da.

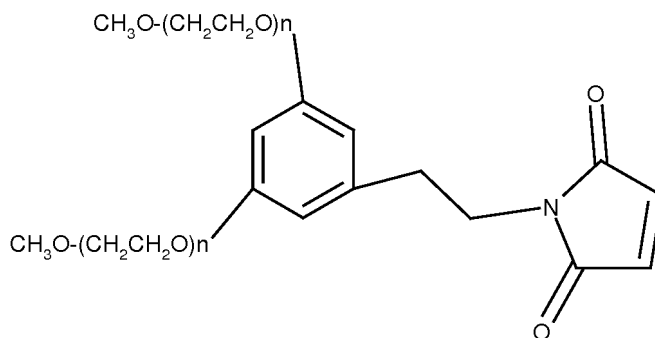
Las moléculas de PEG concretas incluyen la lisina modificada con 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilamida del N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) de PM 20.000), también conocida como PEG2MAL40K (que puede obtenerse en Nektar, antes Shearwater).

Las fuentes alternativas de conectores de PEG incluyen NOF, que suministra GL2-400MA2 (en el que m, en la siguiente estructura, es 5) y GL2-400MA (en el que m es 2), y n es aproximadamente 450:



m es 2 o 5.

Es decir, que cada PEG es de aproximadamente 20.000 Da. Están disponibles otras moléculas efectoras de PEG del siguiente tipo:



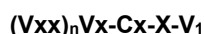
en Dr Reddy, NOF y Jenkem.

20 En una realización se proporciona un anticuerpo que está PEGilado (por ejemplo, con un PEG descrito en la presente), unido a través de un resto aminoácido cisteína al aminoácido 226 o aproximadamente en el aminoácido 226 de la cadena, por ejemplo, el aminoácido 226 de la cadena pesada (mediante numeración secuencial).

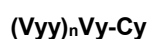
En una realización se proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica una molécula de la presente descripción, tal como una secuencia de ADN.

25 En una realización se proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica uno o más, tal como dos o más componentes de polipéptidos de una molécula de la presente descripción, por ejemplo,

una cadena polipeptídica de fórmula (I):



una cadena polipeptídica de fórmula (II):



30

o un polipéptido de fórmula (III):

V₂

en las que:

V_x representa un dominio variable,

5 V_{xx} representa un dominio variable,

C_x representa CH₁ o C_L,

X representa un conector,

V₁ representa un dominio variable,

V_y representa un dominio variable,

10 V_{yy} representa un dominio variable,

C_y representa CH₁ o C_L,

V₂ representa un dominio variable,

n representa independientemente 0 o 1.

En una realización, el polinucleótido, tal como ADN, está comprendido en un vector.

15 Los expertos en la técnica conocen los métodos generales por los cuales los vectores pueden construirse, así como los métodos de transfección y los métodos de cultivo. A este respecto, se remite a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, Nueva York, y al Manual de Maniatis publicado por Cold Spring Harbor Publishing.

20 También se proporciona una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Puede emplearse cualquier sistema de célula hospedante/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo, de *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o también pueden emplearse sistemas de expresión de células hospedantes eucariotas, por ejemplo, de mamífero. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen
25 células CHO, de mieloma o de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención, que comprende cultivar una célula hospedante que contiene un vector de la presente invención bajo condiciones adecuadas que conducen a la expresión de una proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

30 Para la producción de productos que comprenden cadenas pesadas y ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Como alternativa puede emplearse un único vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada. En un ejemplo, la línea celular puede transfectarse con tres vectores, y cada uno codifica una cadena polipeptídica de una molécula de anticuerpo de la presente invención.
35 En un ejemplo, la línea celular se transfecta con tres vectores y cada uno codifica un polipéptido diferente seleccionado de:

a) una cadena polipeptídica de fórmula (I):

(V_{xx})_nV_x-C_x-X-V₁;

b) una cadena polipeptídica de fórmula (II):

40 **(V_{yy})_nV_y-C_y**

y

c) un polipéptido de fórmula (III):

V₂

en las que:

45 V_x representa un dominio variable,

V_{xx} representa un dominio variable,

C_x representa CH₁ o C_L,

X representa un conector,

V₁ representa un dominio variable,

5 Vy representa un dominio variable,

V_{yy} representa un dominio variable,

C_y representa CH₁ o C_L,

V₂ representa un dominio variable,

n representa independientemente 0 o 1.

10 Se apreciará que puede variarse la proporción de cada vector transfectado en la célula hospedante para optimizar la expresión del producto de anticuerpo multiespecífico. En una realización, la proporción de vectores es de 1:1:1. Se apreciará que los expertos en la técnica pueden determinar una proporción óptima por medio de ensayos habituales de niveles de expresión de proteínas después de la transfección.

15 También se apreciará que cuando dos o más, en particular tres o más de los componentes de polipéptidos son codificados por un polinucleótido en un único vector, la expresión relativa de cada componente de polipéptido puede variar utilizando diferentes promotores para cada polinucleótido que codifica un componente de polipéptido de la presente invención.

20 En una realización, el vector comprende una única secuencia polinucleotídica que codifica las tres cadenas polipeptídicas de la molécula de anticuerpo multiespecífico de la presente invención bajo el control de un único promotor.

En una realización, el vector comprende una única secuencia polinucleotídica que codifica las tres cadenas polipeptídicas de la molécula de anticuerpo multiespecífico de la presente invención, en el que cada secuencia polinucleotídica que codifica cada cadena polipeptídica está bajo el control de un promotor diferente.

25 Los anticuerpos y los fragmentos según la presente descripción se expresan a niveles satisfactorios desde células hospedantes. Así, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos parecen estar optimizadas y conducen al procesamiento comercial.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de un trastorno patológico.

30 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para su uso en un tratamiento y para la fabricación de un medicamento.

La composición habitualmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

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

40 La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico, o puede estar acompañada de otros ingredientes activos, que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-células T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes que no son anticuerpos, tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

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

50 Las composiciones farmacéuticas comprenden, de modo adecuado, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se emplea en la presente, se

- refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o trastorno diana, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquiera anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente en ensayos de cultivo de células o en modelos animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede emplearse para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Después esta información puede usarse para determinar las dosis y las vías útiles para la administración en seres humanos.
- La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de la administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse por medio de la experimentación habitual y según el criterio del médico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Como alternativa, la dosis puede ser de 1 a 500 mg diarios, tal como de 10 a 100, 200, 300 o 400 mg diarios. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de modo conveniente en formas de dosificación unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención.
- Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, de modo simultáneo, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.
- La dosis a la que se va a administrar una molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza del trastorno que se va a tratar, del grado de la inflamación presente y si la molécula de anticuerpo está siendo utilizada de modo profiláctico o para tratar un trastorno existente.
- La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas), será necesario administrar una o más dosis diarias. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días), solo puede ser necesario administrar una dosificación una vez diaria, una vez semanal o incluso una vez cada 1 o 2 meses.
- El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir en sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos.
- Pueden utilizarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener líquidos, tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol. También pueden estar presentes en dichas composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, o sustancias tamponantes del pH. Estos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones para la ingestión por parte del paciente.
- Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión, por ejemplo, mediante una inyección en embolada o una infusión continua. Cuando el producto es para la inyección o la infusión, puede tomar la forma de una suspensión, una disolución o una emulsión en un vehículo oleoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes suspensores, conservantes estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede encontrarse en una forma seca para la reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.
- Tras haber sido formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones se adaptan para la administración a sujetos humanos.
- En una realización, en formulaciones según la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoelectrico del anticuerpo o fragmento, puesto que si el pH de la formulación es 7, entonces puede ser apropiado un pl de 8-9 o mayor. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que esto puede proporcionar, en último término, una formulación final con mayor estabilidad, por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento permanecen en disolución.
- Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por medio de cualquiera de una serie de vías que incluyen, pero no se limitan a la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden emplearse hipopulverizados para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Generalmente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, en forma de disoluciones o suspensiones

líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o la suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Preferiblemente, las moléculas de anticuerpos de la presente invención se administran por vía subcutánea, mediante inhalación o por vía tópica.

5 La administración directa puede realizarse, en general, mediante inyección por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se puede realizar la administración al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse a un tejido específico de interés. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

10 Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, esta es susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Así, si la composición se va a administrar mediante una vía que emplea el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan al anticuerpo frente a la degradación, pero que liberen el anticuerpo tras haber sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Está disponible un profundo análisis de los vehículos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J., 1991).

15 En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para la administración tópica, que incluye la inhalación.

20 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosimétricos que contienen gases propelentes, o disoluciones inhalables sin gases propelentes (tales como disoluciones o suspensiones que pueden nebulizarse). Los polvos inhalables según la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

25 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o sus mezclas. De modo adecuado se emplean mono- o disacáridos, tales como lactosa o glucosa, en particular, pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

30 Las partículas para el depósito en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor que 10 micrómetros, tal como 1-9 micrómetros, por ejemplo, de 0,1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) tiene una importancia crucial. Los gases propelentes que pueden utilizarse para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propelentes adecuados se seleccionan de hidrocarburos, tales como n-propano, n-butano o isobutano, y halocarburos, tales como derivados clorados y/o fluorados del metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes mencionados anteriormente pueden emplearse por sí solos o mezclados.

35 Los gases propelentes particularmente adecuados son derivados de alcanos halogenados seleccionados de TG11, TG12, TG134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y sus mezclas son particularmente adecuados.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propelentes también pueden contener otros ingredientes, tales como codisolventes, estabilizantes, agentes tensioactivos, antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

40 Los aerosoles inhalables que contienen gases propelentes de la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles según la invención contienen, por ejemplo, del 0,002 al 5% en peso, del 0,01 al 3% en peso, del 0,015 al 2% en peso, del 0,1 al 2% en peso, del 0,5 al 2% en peso, o del 0,5 al 1% en peso de sustancia activa.

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

En una realización, la formulación se proporciona como ampollas discretas que contienen una dosis unitaria para el transporte mediante nebulización.

50 En una realización, el anticuerpo se suministra en forma liofilizada para su reconstitución o, como alternativa, como una formulación en suspensión.

El anticuerpo de la invención puede administrarse dispersado en un disolvente, por ejemplo, en forma de una disolución o una suspensión. Puede suspenderse en una disolución fisiológica apropiada, por ejemplo, disolución salina fisiológica, un disolvente farmacológicamente aceptable o una disolución tamponada. Las disoluciones

tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato de disodio, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro, y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para lograr un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Tal como se mencionó anteriormente, puede prepararse una suspensión, por ejemplo, a partir del anticuerpo liofilizado.

- 5 Las formulaciones en forma de suspensiones o disoluciones terapéuticas también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son muy conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina del suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol, y glicerol. Las disoluciones o las suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación en general se proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Estos pueden incluir la producción y la esterilización mediante filtración de la disolución disolvente tamponada utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la disolución disolvente tamponada estéril y la dispensión de la formulación en receptáculos estériles mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

- 15 La formulación nebulizable según la presente descripción puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de unidades de dosis única (por ejemplo, viales o recipientes de plástico sellados) envasados en envueltas de láminas de aluminio. Cada vial contiene una unidad de dosis en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de disolvente/disolución tampón.

Se cree que los anticuerpos de la presente descripción son adecuados para la administración a través de nebulización.

- 20 También se prevé que el anticuerpo de la presente invención pueda administrarse mediante el uso de la terapia génica. Para lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de los componentes apropiados del ADN se introducen en un paciente, de modo que las cadenas del anticuerpo se expresan a partir de las secuencias de ADN y se ensamblan *in situ*.

- 25 La afección o el trastorno patológico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infecciones, artritis, tal como artritis reumatoide, asma, tal como asma grave, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad del intestino inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, ictus, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios mediados por inmunidad del sistema nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía de IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, escleroderma, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad del injerto frente al receptor, rechazo de trasplantes, enfermedad cardíaca, que incluye enfermedades isquémicas, tales como infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, reabsorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipocloridria.

La presente descripción también proporciona una molécula de anticuerpo según la presente invención para su uso en el tratamiento o la profilaxis del dolor, en particular del dolor asociado con la inflamación.

- 40 Por tanto, se proporciona un anticuerpo según la invención para su uso en un tratamiento y métodos de tratamiento que lo emplean.

En una realización, se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular, un anticuerpo según la invención).

- 45 En una realización, se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular, un anticuerpo según la invención) que comprende las etapas de realizar una cromatografía de intercambio aniónico en un modo de no unión, de forma que las impurezas se retienen en la columna y el anticuerpo se mantiene en la fracción no unida. La etapa puede realizarse, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 6-8.

El proceso puede comprender además una etapa de captura inicial que emplea una cromatografía de intercambio catiónico realizada, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4 a 5.

- 50 El proceso puede comprender además una o más etapas de cromatografía adicionales para asegurarse de que el producto y las impurezas relacionadas con el proceso se resuelvan de modo apropiado de la corriente del producto.

El proceso de purificación también puede comprender una o más etapas de ultrafiltración, tales como una etapa de concentración y diafiltración.

Una forma purificada, tal como se ha empleado anteriormente, se refiere a una pureza de al menos 90%, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% en p/p o más puro.

Sustancialmente exento de endotoxinas en general se refiere a un contenido en endotoxinas de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 0,5 o 0,1 EU por mg de producto.

5 Sustancialmente exento de ADN o proteínas de la célula hospedante en general se refiere a un contenido en ADN y/o proteínas de la célula hospedante de 400 µg por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100 µg por mg o menor, en particular 20 µg por mg, según sea apropiado.

La molécula de anticuerpo de la presente invención también puede emplearse en el diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico y la formación de imágenes *in vivo* de estados de enfermedad que implican a OX40.

Comprende, en el contexto de la presente memoria descriptiva, significa incluye.

Cuando sea apropiado desde el punto de vista técnico, las realizaciones de la invención pueden combinarse.

10 Las realizaciones se describen en la presente como que comprenden ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a realizaciones distintas que consisten o que consisten fundamentalmente en dichas características/elementos.

La presente se describe más a fondo solo como ilustración en los siguientes ejemplos, que remiten a las figuras adjuntas.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Fab-dsFv de conector único

Construcción de los plásmidos A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-645dsscFv para la expresión en células de mamífero

20 Se construyeron proteínas de fusión de A26Fab para la expresión de A26Fab-645dsFv y A26Fab-645dsFv de conector único (véase la figura 1), condensando 645vL al C-terminal de la región constante kappa humana de alotipo Km3 de la cadena ligera de A26 empleando el conector flexible SGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:103), o condensando 645vH al C-terminal de la región constante CH1 gamma-1 humana de isotipo y1 de la cadena pesada de A26 empleando el conector flexible SGGGGSGGGGTGGGGGS (SEQ ID NO:78). Además, se introdujeron mutaciones puntuales en las secuencias de ADN en restos seleccionados en la región de marco de 645vL y 645vH.

25 Las mutaciones (cadena pesada G44C y cadena ligera G100C) se introdujeron para crear un enlace disulfuro intercatenario entre las cadenas pesada y ligera de 645Fv. Se construyeron las proteínas de fusión de A26Fab para la expresión de A26Fab-645dsscFv (véase la figura 1) como sigue. Se construyó un Fv monocatenario (scFv) uniendo el N-terminal de 645vL al C-terminal de 645vH a través del conector flexible GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:79). Se introdujeron mutaciones puntuales en las secuencias de ADN en los restos de la región de marco G100C en 645vL y G44C en 645vH para obtener el scFv unido con disulfuro (dsscFv). Después 645dsscFv se condensó con el C-terminal de la región constante kappa humana de alotipo Km3 de la cadena ligera de A26 empleando el conector flexible SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:104), o de la región constante CH1 gamma-1 humana de isotipo y1 de la cadena pesada de A26 empleando el conector flexible SGGGGTGGGGGS (SEQ ID NO:80). La cadena ligera de A26Fab-645dsvL, cadena pesada A26Fab-645dsvH, cadena ligera de A26Fab, cadena pesada de A26Fab, dominio libre 645dsvL, dominio libro 645dsvH, cadena ligera de A26Fab-645dsscFv y cadena pesada de A26Fab-645dsscFv se fabricaron de modo químico y se clonaron individualmente en vectores de expresión de mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia de poliA de SV40E.

Expresión en HEK293 de A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-645dsscFv

40 Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos pertinentes empleando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se mezclaron como sigue para expresar las diferentes construcciones: para A26Fab-645dsFv, los plásmidos fueron A26Fab pesada-(S, 3xG4S/T)-645dsvH y A26Fab ligera-(S, 3xG4S)-645dsvL; para A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL), los plásmidos fueron A26Fab pesada, 645dsvH y A26Fab ligera-(S, 3xG4S)-645dsvL; para A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH), los plásmidos fueron A26Fab pesada-(S, 3xG4S/T)-645dsvH, A26Fab ligera y 645dsvL; para A26Fab-645dsscFv (HC-scFv), los plásmidos fueron A26Fab pesada-(S, 2xG4S/T)-645dsscFv(vH-4xG4S-vL) y A26Fab ligera; y para A26Fab-645dsscFv (LC-scFv), los plásmidos fueron A26Fab pesada y A26Fab ligera-(S, 2xG4S)-645dsscFv(vH-4xG4S-vL). Además, también se varió la proporción de los plásmidos utilizados para las transfecciones: para las combinaciones de 2 plásmidos, la proporción fue de 1:1, mientras que para las combinaciones de 3 plásmidos se ensayaron varias proporciones diferentes. Se incubó un total de 50 µg de ADN de plásmido con 125 µl de 293fectin + 4,25 ml de medio Optimem durante 20 min a temperatura ambiente. Después la mezcla se añadió a 50 ml de células HEK293 en suspensión a 1 x 10⁶ células/ml y se incubó con agitación a 37°C. Los sobrenadantes se recolectaron en el día 7 mediante centrifugación a 1500 g para retirar las células y se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm. El nivel de expresión se determinó mediante HPLC de proteína G.

55

5 El nivel de expresión de todas las construcciones fue comparable (véase la tabla 4), cubriendo el intervalo de 3-15 $\mu\text{g/ml}$. El Fab-dsFv se expresó a 13-14 $\mu\text{g/ml}$, el Fab-dsscFv se expresó a 7-15 $\mu\text{g/ml}$, y el Fab-dsFv de conector único se expresó a 3-13 $\mu\text{g/ml}$. En la bibliografía existen informes que indican que el nivel de expresión de regiones Fv que carecen de un conector entre vL y vH o de un motivo de dimerización para juntar vL y vH es sustancialmente menor que el de Fv conectados. Esto no se observa en estos datos, en los que no se detectan diferencias significativas entre la mejor expresión de cada tipo de construcción.

Tabla 4

Construcción	Nivel de expresión ($\mu\text{g/ml}$)
A26Fab-645dsFv	13,2-14,2
A26Fab-645dsscFv (LC-scFv)	14,0-15,2
A26Fab-645dsscFv (HC-scFv)	6,6-7,1
A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:1:1)	5,1-6,9
A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:1:2)	3,3-3,5
A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 2:1:2)	4,2-4,4
A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:2:2)	4,2-4,3
A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 1:1:1)	6,8-12,6
A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 1:1:2)	7,8-8,1
A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 2:1:2)	7,6-8,2

10 Análisis BIAcore de A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-645dsscFv expresados en HEK293

15 Se determinaron las afinidades de unión y los parámetros cinéticos para las interacciones de las construcciones de Fab-dsFv, Fab-dsscFv y FabdsFv de conector único mediante resonancia de plasmón de superficie ("surface plasmon resonance", SPR) realizada en un BIAcore T100 utilizando chips detectores CM5 y tampón de ensayo HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05% en v/v). Las muestras de Fab-dsFv de conector único se capturaron sobre la superficie del chip detector empleando Fab de cabra específico de F(ab')₂ humano (Jackson ImmunoResearch, 109-006-097) o un anticuerpo monoclonal anti-CH1 humano generado en el laboratorio. Se logró la inmovilización covalente del anticuerpo de captura mediante la química de acoplamiento de amina convencional.

20 Cada ciclo de ensayo consiste en capturar en primer lugar la construcción de Fab-dsFv, Fab-dsscFv o Fab-dsFv de conector único empleando una inyección de 1 min, antes de una fase de asociación que consiste en una inyección de antígeno de 3 min, tras lo cual la disociación se controló durante 5 min. Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con inyecciones 2 x 1 min de HCl 40 mM, seguidas de 30 s de NaOH 5 mM. Los caudales utilizados fueron de 10 $\mu\text{l/min}$ para la captura, 30 $\mu\text{l/min}$ para las fases de asociación y disociación, y 10 $\mu\text{l/min}$ para la regeneración.

25 Para los ensayos cinéticos se realizó una titulación de la albúmina de suero humana 50-6,25 nM, o una única concentración de OX40 de 25 nM. Se empleó una célula de flujo como blanco para restar la referencia y se incluyeron inyecciones de tampón como blanco para restar la deriva y el ruido del instrumento.

Los parámetros cinéticos se determinaron mediante ajuste global simultáneo de los sensogramas resultantes a un patrón de modelo de unión 1:1 empleando el software de evaluación de BIAcore T100.

30 Las constantes de afinidad, las constantes de disociación y las afinidades de todas las muestras fueron similares para ambos antígenos, la albúmina de suero humana ("human serum albumin", HSA) y el OX40 humano (véase la tabla 5). Por tanto, la presencia y la posición de los diferentes conectores en las diferentes construcciones no tienen un efecto significativo sobre la afinidad de cualquier región variable por su antígeno.

Tabla 5

Muestra	Antígeno	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	Antígeno	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
A26Fab-645dsFv (inicio)	HSA	7,51E+04	1,52E-04	2,01	OX40	1,70E+05	1,53E-05	90
A26Fab-645dsscFv (HC-scFv)	HSA	1,83E+05	2,40E-04	1,31	OX40	1,66E+05	2,34E-05	141
A26Fab-645dsscFv (LC-scFv)	HSA	1,72E+05	2,22E-04	1,29	OX40	1,78E+05	1,82E-05	102
A26Fab-645dsFv de conector único (LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:1:1)	HSA	7,40E+04	2,35E-04	3,17	OX40	2,29E+05	2,64E-05	115
A26Fab-645dsFv de conector único (LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:1:2)	HSA	1,13E+05	2,62E-04	2,31	OX40	1,84E+05	1,80E-05	98
A26Fab-645dsFv de conector único (LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 2:1:2)	HSA	1,26E+05	1,88E-04	1,49	OX40	1,70E+05	1,69E-05	99
A26Fab-645dsFv de conector único (LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:1:1)	HSA	9,10E+04	2,23E-04	2,46	OX40	1,54E+05	1,70E-05	110
A26Fab-645dsFv de conector único (HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 1:1:1)	HSA	2,09E+05	2,09E-04	1,00	OX40	1,73E+05	3,51E-05	203
A26Fab-645dsFv de conector único (HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 1:1:2)	HSA	2,11E+05	2,34E-04	1,11	OX40	1,92E+05	1,00E-05	52
A26Fab-645dsFv de conector único (HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 2:1:2)	HSA	1,97E+05	2,07E-04	1,05	OX40	1,94E+05	1,97E-05	101
A26Fab-645dsFv (final)	HSA	6,82E+04	2,12E-04	3,11	OX40	1,93E+05	1,98E-05	102

Purificación con proteína G de A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-645dsscFv expresados en HEK293

- 5 Se concentraron en aproximadamente 25 veces los aproximadamente 50 ml de sobrenadantes de HEK293 hasta aproximadamente 2 ml empleando concentradores de centrifugación con un límite de exclusión de peso molecular de 10 kDa. Los sobrenadantes concentrados se aplicaron a una columna de 1 ml HiTrap Protein-G FF (GE Healthcare) equilibrada con fosfato 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4, y el material unido se eluyó con glicina 0,1 M/HCl, pH 2,7. El pico de elución se recogió y el pH se ajustó a aproximadamente pH 7 con Tris 2 M/HCl, pH 8,5. Las eluciones con el pH ajustado se concentraron y se intercambió el tampón a PBS, pH 7,4, empleando concentradores de centrifugación con un límite de exclusión de peso molecular de 10 kDa.

Análisis de SDS-PAGE de A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-645dsscFv expresados en HEK293 y purificados con proteína G

- 15 Las muestras se diluyeron con agua cuando fue necesario y después a 26 μ l se le añadieron 10 μ l de 4x tampón de

muestra Bis-Tris LDS y 4 μ l de 10X agente reductor para las muestras reducidas. Las muestras se agitaron en vórtice, se incubaron a 100°C durante 3 minutos, se enfriaron y se centrifugaron a 12500 rpm durante 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron sobre un gel de SDS Tris/glicina acrilamina al 4-20% y se ensayaron durante 110 minutos a 125 V de voltaje constante. Los geles se tiñeron con tinte de proteínas azul de Coomassie (véase la figura 2).

El gel de SDS-PAGE reductor presenta unos patrones de bandas con respecto a la posición de la migración y la intensidad de la tinción que son coherentes con que todas las construcciones se están expresando correctamente. Para Fab-dsFv, carril 2, deben aparecer 2 bandas a aproximadamente 36 y aproximadamente 37 kDa con una tinción más o menos equivalente. Para Fab-dsscFv (LC-scFv), carril 3, deben aparecer 2 bandas a aproximadamente 51 y aproximadamente 23 kDa con una intensidad de tinción de más o menos el doble en la banda superior. Para Fab-dsscFv (HC-scFv), carril 4, deben aparecer 2 bandas a aproximadamente 50 y aproximadamente 26 kDa con una intensidad de tinción de más o menos el doble en la banda superior. Para Fab-dsFv de conector único (LC-vL), carriles 6-9, deben aparecer 3 bandas a aproximadamente 36, aproximadamente 23 y aproximadamente 13 kDa con una intensidad de tinción más o menos en la proporción de 3:2:1 desde la banda superior a la inferior. Para Fab-dsFv de conector único (HC-vH), carriles 10-12, deben aparecer 3 bandas a aproximadamente 37, aproximadamente 26 y aproximadamente 12 kDa con una intensidad de tinción más o menos en la proporción de 3:2:1 desde la banda superior a la inferior.

Análisis de G3000 SEC-HPLC de A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-645dsscFv expresados en HEK293 y purificados con proteína G

Se inyectaron muestras de 50 μ g sobre una columna TSK Gel G3000SWXL, 7,8 x 300 mm (Tosoh) y se revelaron con un gradiente isocrático de fosfato 200 mM, pH 7,0 a 1 ml/min. La detección de la señal fue mediante la absorbancia a 280 nm (véase la figura 3). Después de la purificación de proteína G, A26Fab-645dsFv está aproximadamente al 45% de monómeros, A26Fab-645dsscFv presentan una cantidad ligeramente mayor de monómeros en el intervalo del 55-60%, mientras que los A26Fab-645dsFv de conector presentan todos un exceso del 80% de monómeros y algunos 100% de monómeros.

Ejemplo 2: Construcción de los plásmidos A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-648dsFv de gen triple para su expresión en células de mamífero

Los plásmidos de gen triple se construyeron generando en primer lugar un vector de gen doble intermedio a partir de los componentes de genes individuales de los formaos de Fab-dsFv de conector único según se describe en el ejemplo 1 y la figura 1. El fragmento de gen que codifica la expresión de la cadena pesada que incluye el promotor hCMV-MIE, la cadena pesada y la región poliA de SV40 se subclonó cadena abajo del gen de cadena ligera en un vector de expresión de mamífero. La cadena pesada es una cadena pesada de A26 Fab o A26 Fab pesada unida a 645dsvH o 648dsvH a través de un conector (S, 3xG₄S), y la cadena ligera es A26 Fab ligera unida a 645dsvL o 648dsvL a través de un conector (S, 3xG₄S) o una cadena ligera de A26 Fab, respectivamente. Esto generó el plásmido de gen doble intermedio para cada formato. Para construir el plásmido de gen triple, el fragmento que codifica la expresión de la región v cognada libre (645dsvL, 648dsvL, 645dsvH o 648dsvH) después se subclonó en un sitio de restricción exclusivo cadena abajo del gen de cadena pesada en el vector intermedio. Para finalizar, para la futura generación de líneas de células estables, un marcador de selección de mamífero se subclonó en los plásmidos de expresión. Esto proporcionó un conjunto de plásmidos que contenían los genes pertinentes para la expresión de Fab-dsFv de conector único a unas proporciones equivalentes de genes, con o sin un marcador de selección de mamífero. Estos plásmidos se emplearán para la evaluación inicial en un sistema de expresión de mamífero transitorio para la comparación con la proporción de monómero (figura 3) de Fab-dsFv de conector único expresados a partir de plásmidos de genes únicos.

Expresión transitoria de A26Fab-645dsFv y A26Fab-648dsFv de conector único a partir de plásmidos de gen triple en células CHO

Se cultivaron células CHO en medio CD CHO suplementado con 1x L-glutaMAX (Life Technologies) hasta la fase exponencial con >99% de viabilidad. Las células se prepararon lavando en disolución salina equilibrada de Earle (Life Technologies) y el ADN del plásmido se electroporó en las células CHO según las recomendaciones del laboratorio. Las células transfectadas se trasladaron a medio CD CHO suplementado con 1x L-glutaMAX y 1x disolución antimicótica (Life Technologies) y se incubaron en un agitador orbital durante 24 h a 37°C, 8% de CO₂, y agitación a 140 rpm. Tras la incubación, o cuando los cultivos alcanzaron una densidad de células viables de al menos 2 x 10⁶ células ml⁻¹, la temperatura disminuyó hasta 32°C. Después de 72 h tras la transfección se añadió butirato de sodio 3 mM (Sigma Aldrich) y los cultivos se volvieron a incubaron durante 11 días más a 32°C, con 8% de CO₂ y agitación a 140 rpm. El sobrenadante se recolectó mediante centrifugación y se filtró sucesivamente a través de filtros estériles de 0,45 μ M y 0,22 μ M. Las titulaciones de expresión se cuantificaron mediante HPLC de proteína G frente a un patrón de fragmento Fab.

El nivel de expresión de los plásmidos de triple gen depende de la presencia del marcador de selección de mamífero (véase la figura 5). Las titulaciones de expresión fueron mayores entre las proteínas de A26 Fab-dsFv de conector único expresadas a partir de los plásmidos sin marcador de selección de mamífero, mientras que se obtuvieron unos

niveles más bajos, pero comparables, si se expresan a partir de plásmidos con el marcador de selección de mamífero, tal como se esperaría debido a la carga metabólica resultante de la expresión de un gen extra. Además, se observaron unas titulaciones de expresión mayores para las proteínas que contenían A26 Fab ligera unida a una cadena de 645dsV o 648dsV.

- 5 Purificación de proteína G de A26Fab-645dsFv y A26Fab-648dsFv de conector único expresados a partir de plásmidos de gen triple en células CHO

Se concentraron los 200 ml de los sobrenadantes en aproximadamente 20 veces empleando concentradores de centrifugación con un límite de exclusión de peso molecular de 10 kDa. Los sobrenadantes concentrados se aplicaron a una columna de 1 ml HiTrap Protein-G FF (GE Healthcare) equilibrada con fosfato 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4, y el material unido se eluyó con glicina 0,1 M/HCl, pH 2,7. El pico de elución se recogió y el pH se ajustó a aproximadamente pH 7 con Tris 2 M/HCl, pH 8,5. Las eluciones con el pH ajustado se concentraron y se intercambiaron el tampón a PBS, pH 7,4, empleando concentradores de centrifugación con un límite de exclusión de peso molecular de 10 kDa. Se calcularon las concentraciones de proteína de modo espectrofotométrico a A_{280} .

- 10
- 15 Análisis de SDS-PAGE de A26Fab-645dsFv y A26Fab-648dsFv de conector único purificados con proteína G expresados a partir de plásmidos de gen triple en células CHO

Se diluyeron las muestras de proteína en PBS cuando fue necesario. A 8,25 μ l de la siguiente muestra se le añadieron 3,75 μ l de 4x tampón de muestra Bis-Tris LDS (Life Technologies), 1,5 μ l de N-etilmaleimida 100 mM, y 1,5 μ l de 10X agente reductor para las muestras reducidas. Las muestras se agitaron en vórtice, se incubaron a 100°C durante 3 minutos, se enfriaron y se centrifugaron a 13200 rpm durante 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron sobre un gel de SDS Tris/glicina acrilamina al 4-20% (Life Technologies) y se ensayaron en tampón Tris-glicina durante aproximadamente 150 minutos a 125 V de voltaje constante. Se empleó un patrón de proteínas de SDS-PAGE, Seebblue2 (Life Technologies) como marcador patrón. Los geles se tiñeron con tinte de proteínas azul de Coomassie InstantBlue (Expedeon) y se destiñeron con agua destilada (véase la figura 6).

- 20
- 25 El gel de SDS-PAGE reductor presenta unos patrones de bandas con respecto a la posición de la migración y la intensidad de la tinción que son coherentes con que todas las construcciones se están expresando correctamente. Para todos los Fab-dsFv de conector único deben aparecer 3 bandas a aproximadamente 36-37 (i), aproximadamente 24-26 (ii) y aproximadamente 12-13kDa (iii), con una intensidad de tinción más o menos en la proporción de 3:2:1 desde la banda superior a la inferior.

- 30 G3000 SEC-HPLC de A26Fab-645dsFv y A26Fab-648dsFv de conector único purificados con proteína G expresados a partir de plásmidos de gen triple en células CHO

Se inyectaron muestras de 50 μ l en una columna TSK Gel G3000SWXL, 7,8 x 300mm (Tosoh) y se revelaron con un gradiente isocrático de fosfato 200 mM, pH 7,0 a 1 ml/min. La detección de la señal fue mediante la absorbancia a 280 nm (véase la figura 7). Todos los A26Fab-645dsFv de conector único expresados a partir de plásmidos de triple gen, independientemente de la presencia de un marcador de selección de mamífero o del nivel de expresión, lograron un exceso de 90% de monómero, siendo la mayoría 100% de monómero. Estos datos concuerdan bastante bien con los A26Fab-dsFv de conector único monoméricos expresados a partir de plásmidos de gen único (figura 3). Esto también indica que una proporción equivalente de genes de los genes pertinentes que codifican el formato, presentes en la configuración de plásmido de triple gen, es óptima para la expresión de Fab-dsFv de conector único con alta proporción de monómeros.

- 35
- 40

Listado de secuencias

<110> UCB Pharma SA

<120> Anticuerpos de Fab-Fv de conector único y métodos para producirlos

<130> G0182 WO

- 45 <150> 1223276.5
<151> 21-12-2012

<160> 104

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

- 50 <211> 357

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> A26 Fab Pesada-(S, 3xG4S/T)-645dsVH

ES 2 689 470 T3

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

ES 2 689 470 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
 275 280 285

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

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

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
 325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
 355

<210> 2

<211> 342

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> A26 Fab Ligera-(S, 3xG4S)-645dsvL

ES 2 689 470 T3

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 225 230 235 240

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
 245 250 255

ES 2 689 470 T3

Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
260 265 270

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly
275 280 285

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
290 295 300

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly
305 310 315 320

Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
325 330 335

Val Glu Ile Lys Arg Thr
340

<210> 3

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL)

A26 Fab Pesada

10 <400> 3

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 689 470 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL)
 645dsvH

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 689 470 T3

<220>

<223> A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL)

A26 Fab Ligera-(S, 3xG4S)-645dsvL

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 689 470 T3

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
225 230 235 240

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
245 250 255

Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
260 265 270

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly
275 280 285

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
290 295 300

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly
305 310 315 320

Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
325 330 335

Val Glu Ile Lys Arg Thr
340

<210> 6

<211> 357

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH)

A26 Fab Pesada-(S, 3xG4S/T)-645dsvH

10 <400> 6

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

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

ES 2 689 470 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp

ES 2 689 470 T3

275

280

285

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

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

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
355

<210> 7

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH)

A26 Fab Ligera

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

10 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

ES 2 689 470 T3

115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH)
 645dsvL

10 <400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 9
 15 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 689 470 T3

<220>

<223> A26Fab-645dsscFv (HC-scFv)

A26 Fab Pesada-(S, 2xG4S/T)-645dsscFv(vH-4xG4S-vL)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

ES 2 689 470 T3

<210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> A26Fab-645dsscFv (HC-scFv)
 A26 Fab Ligera

<400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 11
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> A26Fab-645dsscFv (LC-scFv)
 A26 Fab Pesada

ES 2 689 470 T3

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

- 5 <210> 12
- <211> 478
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- 10 <223> A26Fab-645dsscFv (LC-scFv)
- A26 Fab Ligera-(S, 2xG4S)-645dsscFv(vH-4xG4S-vL)

ES 2 689 470 T3

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 689 470 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn
 245 250 255

Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp
 260 265 270

Ile Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala
 275 280 285

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 290 295 300

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

Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp
 325 330 335

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 355 360 365

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 370 375 380

ES 2 689 470 T3

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu
385 390 395 400

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
405 410 415

Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
420 425 430

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
435 440 445

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp
450 455 460

Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
465 470 475

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector de bisagra

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala

1 5

10 <210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Conector de bisagra

<400> 14

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 18

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector de bisagra

<400> 15

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

1 5 10 15

25 Pro Ala

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Conector de bisagra

ES 2 689 470 T3

<400> 16

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

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
20 25

<210> 17

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector de bisagra

<400> 17

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

10 Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
20 25 30

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Conector de bisagra

<400> 18

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

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

20 <210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector de bisagra

25 <400> 19

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

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector de bisagra

<400> 20

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

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

35 <210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector de bisagra
 <400> 21
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala
 1 5 10
 5 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Conector flexible
 <400> 22
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 1 5
 <210> 23
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 23
Asp Lys Thr His Thr Ser
 20 1 5
 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Conector flexible
 <220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 30 <223> S o ausente
 <400> 24
Xaa Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 25
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <220>
 40 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> S o ausente
 <400> 25
Xaa Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 45 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Conector flexible

<220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> S o ausente

5 <400> 26
 Xaa Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Conector flexible

<220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> S o ausente

15 <400> 27
 Xaa Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser
 20

20 <210> 28
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector flexible

25 <220>
 <221> X
 <222> (1)..(1)
 <223> S o ausente

<400> 28
 Xaa Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

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

30 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Conector flexible

<400> 29
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10

40 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector flexible

45 <220>
 <221> X

ES 2 689 470 T3

<222> (7)..(7)
 <223> Aminoácido

<400> 30
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10 15

5 <210> 31
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Conector flexible

<220>
 <221> X
 <222> (7)..(7)
 <223> Aminoácido

15 <220>
 <221> X
 <222> (12)..(12)
 <223> Aminoácido

<400> 31
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Ser Ala Ser
 20 20

<210> 32
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Conector flexible

<220>
 <221> X
 <222> (7)..(7)
 30 <223> Aminoácido

<220>
 <221> X
 <222> (12)..(12)
 <223> Aminoácido

35 <220>
 <221> X
 <222> (17)..(17)
 <223> Aminoácido

<400> 32
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 40 20 25

<210> 33
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Conector flexible

ES 2 689 470 T3

<220>
 <221> X
 <222> (7)..(7)
 <223> Aminoácido

5

<220>
 <221> X
 <222> (12)..(12)
 <223> Aminoácido

10

<220>
 <221> X
 <222> (17)..(17)
 <223> Aminoácido

15

<220>
 <221> X
 <222> (22)..(22)
 <223> Aminoácido

<400> 33
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 20 25 30

20

<210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector flexible

25

<220>
 <221> X
 <222> (7)..(7)
 <223> Aminoácido

<400> 34
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10

30

<210> 35
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Conector flexible

<400> 35
 Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr
 1 5 10 15

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

40

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector flexible

45

<400> 36
 Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
 1 5 10

<210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 37
 Ala Thr Thr Thr Gly Ser
 1 5
 <210> 38
 10 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 15 <400> 38
 Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu
 1 5 10 15
 Ser His Lys Ser Pro
 20
 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 39
 Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 25 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Conector flexible
 <400> 40
 Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 41
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 41
 Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser
 40 1 5 10 15
 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Conector flexible

ES 2 689 470 T3

<400> 42
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 43
 Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
 10 1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 44
 Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 20 <210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 25 <400> 45
 Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 46
 Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Arg Pro
 35 <210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Conector flexible
 <400> 47
 Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu
 1 5 10 15
 Thr Thr
 <210> 48
 <211> 18
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 689 470 T3

<220>

<223> Conector flexible

<400> 48

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

Phe Asn

5 <210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Conector flexible

<400> 49

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

Pro Ala

15 <210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Conector flexible

<400> 50

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

Arg Thr

<210> 51

<211> 18

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector flexible

<400> 51

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

30 Phe Gly

<210> 52

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Conector flexible

<400> 52

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

Gly Ala

<210> 53

40 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 689 470 T3

<220>

<223> Conector flexible

<400> 53

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

Asp Leu

5 <210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Conector flexible

<400> 54

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

Ser Leu

<210> 55

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector flexible

<400> 55

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

20 Ile Ser

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Conector flexible

<400> 56

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

Pro

30

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Conector flexible

<400> 57

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

Pro Pro

40 <210> 58

<211> 18

ES 2 689 470 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 5 <400> 58
 Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
 1 5 10 15

 Pro Tyr
 <210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 59
 Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
 1 5 10 15

 Pro
 15 <210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Conector flexible
 <400> 60
 Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn
 1 5 10 15

 Leu Arg
 <210> 61
 <211> 18
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Conector flexible
 <400> 61
 Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr
 1 5 10 15

 Phe Pro
 30 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Conector rígido
 <400> 62
 Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
 1 5 10
 <210> 63
 40 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector rígido

<400> 63
 Pro Pro Pro Pro
 1

5 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

<400> 64
 Asp Leu Cys Leu Arg Asp Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10

<210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

<400> 65
 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

<400> 66
 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Gly Asp
 1 5 10 15

<210> 67
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

<400> 67
 Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Glu Asp Asp Glu
 20

<210> 68
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

<400> 68
 Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Arg Ser Val
 20

<210> 69
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina
 <400> 69
 Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

 Gly Arg Ser Val Lys
 20
 10 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina
 15 <400> 70
 Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
 1 5 10 15

 <210> 71
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina
 <400> 71
 Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1 5 10 15
 25 Asp Asp

 <210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina
 <400> 72
 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
 1 5 10 15

 <210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina
 40 <400> 73
 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
 1 5 10 15

 <210> 74
 <211> 18
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

ES 2 689 470 T3

<400> 74
 Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1 5 10 15

Asp Asp

<210> 75
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

<400> 75
 Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys
 1 5 10 15

10 Pro Leu Arg Gly
 20

<210> 76
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

<400> 76
 Arg Ala Pro Glu Ser Phe Val Cys Tyr Trp Glu Thr Ile Cys Phe Glu
 1 5 10 15

Arg Ser Glu Gln
 20

20 <210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptidos de unión a albúmina

25 <400> 77
 Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met
 1 5 10

30 <210> 78
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector flexible de xadena pesada A26

<400> 78
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

35 <210> 79
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Conector flexible

ES 2 689 470 T3

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 80

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector flexible de cadena pesada A26

<400> 80

10 Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 81

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Fab LC

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 689 470 T3

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 82

<211> 356

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fab-648gH1 HC

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 689 470 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ala Met Thr Trp
260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile Thr
275 280 285

Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

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

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Val Ser
325 330 335

Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
340 345 350

Thr Val Ser Ser
355

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

ES 2 689 470 T3

<220>

<223> 648gL1

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

<210> 84

5 <211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fab HC

10 <400> 84

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

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

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

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

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

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

ES 2 689 470 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 85

<211> 342

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fab-648gL1 LC

<400> 85

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

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

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

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

10

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

ES 2 689 470 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr
 225 230 235 240

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
 245 250 255

Gln Ser Ile Gly Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 260 265 270

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val
 275 280 285

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 290 295 300

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
 305 310 315 320

Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 325 330 335

Val Glu Ile Lys Arg Thr
 340

5

<210> 86
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> 648gH1

ES 2 689 470 T3

<400> 86

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 645 CDRH1

<400> 87

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

10

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> 645 CDRH2

<400> 88

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

20

<210> 89

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 645 CDRH3

25

<400> 89

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

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

30

<213> Artificial

ES 2 689 470 T3

<220>
 <223> 645 CDRL1
 <400> 90
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 5 <210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> 645 CDRL2
 <400> 91
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 <210> 92
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645 CDRL3
 <400> 92
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 20 1 5 10
 <210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> 648 CDRH1
 <400> 93
 Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ala Met Thr
 1 5 10
 <210> 94
 30 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 648 CRDH2
 35 <400> 94
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 95
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> 648 CRDH3
 <400> 95
 Gly Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu
 1 5 10
 45 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> 648 CDRL1

ES 2 689 470 T3

<400> 96
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Arg Leu Ala
 1 5 10
 <210> 97
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 648 CDRL2
 <400> 97
 Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser
 10 1 5
 <210> 98
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 648 CDRL3
 <400> 98
 Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 99
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-albúmina (no ds)
 25 <400> 99
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 100
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30

ES 2 689 470 T3

<220>

<223> b) Dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-albúmina (ds)

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

- 5 <210> 101
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

10 <223> (c) Dominio variable de cadena ligera de anticuerpo anti-albúmina (no ds)

<400> 101

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 689 470 T3

<210> 102
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> d) Dominio variable de cadena ligera de anticuerpo anti-albúmina (ds)

<400> 102
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

10 <210> 103
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia conectora

15 <400> 103
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

20 <210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia conectora

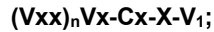
<400> 104
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

25

REIVINDICACIONES

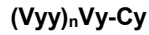
1.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico que consiste en tres polipéptidos:

a) una cadena polipeptídica de fórmula (I):



5 y

b) una cadena polipeptídica de fórmula (II):



c) un polipéptido de fórmula (III):



10 en las que:

V_x representa un dominio variable,

V_{xx} representa un dominio variable,

C_x representa CH₁ o C_L,

X representa un conector,

15 V₁ representa un dominio variable,

V_y representa un dominio variable,

V_{yy} representa un dominio variable,

C_y representa CH₁ o C_L,

V₂ representa un dominio variable,

20 n representa independientemente 0 o 1,

en la que la cadena polipeptídica de fórmula (I) y la cadena polipeptídica de fórmula (II) están alineadas, de modo que las regiones constantes C_x y C_y están apareadas y solo una de C_x o C_y es CH₁, los dominios variables V_x y V_y están apareados para formar un dominio de unión, los dominios variables V₁ y V₂ están apareados para formar un dominio de unión, y un enlace disulfuro está presente entre V₁ y V₂.

25 2.- Una molécula de anticuerpo biespecífico que consiste en tres polipéptidos:

a) una cadena pesada de fórmula (Ia):



y

b) una cadena ligera de fórmula (IIa):

30
$$VL - CL$$

c) un polipéptido de fórmula (III):



en las que:

VH representa un dominio variable de cadena pesada,

35 CH₁ representa el dominio 1 de la región constante de cadena pesada,

X representa un conector,

V₁ representa un dominio variable,

VL representa un dominio variable de cadena ligera,

C_L representa una región constante procedente de una cadena ligera,

V_2 representa un dominio variable,

en la que está presente un enlace disulfuro entre V_1 y V_2 .

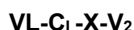
3.- Una molécula de anticuerpo biespecífico que consiste en tres polipéptidos:

- 5 a) una cadena pesada de fórmula (Ib):



y

- b) una cadena ligera de fórmula (IIb):



- 10 c) un polipéptido de fórmula (III):



en las que:

VH representa un dominio variable de cadena pesada,

CH₁ representa el dominio 1 de la región constante de cadena pesada,

- 15 X representa un conector,

V_1 representa un dominio variable,

VL representa un dominio variable de cadena ligera,

C_L representa una región constante procedente de una cadena ligera,

V_2 representa un dominio variable,

- 20 en la que está presente un enlace disulfuro entre V_1 y V_2 .

4.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que V_1 representa un dominio variable de cadena pesada y V_2 representa un dominio variable de cadena ligera.

- 25 5.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la pareja de dominios variables V_1/V_2 está unida mediante un enlace disulfuro entre dos restos cisteína modificados, uno en V_1 y uno en V_2 , en la que la posición de la pareja de restos cisteína modificados se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43, y VH106 y VL57; y en la que las posiciones se numeran según Kabat.

- 30 6.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la pareja de dominios variables V_1/V_2 tiene especificidad por una proteína portadora sérica.

- 35 7.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según la reivindicación 6, en la que V_1 comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:87 para CDRH-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:88 para CDRH2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:89 para CDRH-3, y V_2 comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:90 para CDRL-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:91 para CDRL2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:92 para CDRL-3.

- 40 8.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según la reivindicación 6, en la que V_1 comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:93 para CDRH-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:94 para CDRH2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:95 para CDRH-3, y V_2 comprende la secuencia que aparece en SEQ ID NO:96 para CDRL-1, la secuencia que aparece en SEQ ID NO:97 para CDRL2, y la secuencia que aparece en SEQ ID NO:98 para CDRL-3.

9.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que X tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:78.

10.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según la reivindicación 3, en la que X tiene la secuencia que aparece en SEQ ID NO:103.

11.- Un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12.- Un vector que comprende un polinucleótido definido en la reivindicación 11.

5 13.- Una célula hospedante que comprende el vector o el polinucleótido de la reivindicación 12 o 11, respectivamente.

14.- Una célula hospedante que comprende tres vectores, comprendiendo cada vector un polinucleótido que codifica una cadena polipeptídica diferente de una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

10 15.- Un proceso que comprende expresar una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico desde una célula hospedante definida en la reivindicación 13 o la reivindicación 14.

16.- Una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y al menos un excipiente.

17.- Una molécula de anticuerpo multiespecífico o biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición farmacéutica según la reivindicación 16, para su uso en un tratamiento.

15

Figura 1A A26Fab-645dsFv

A26 Fab pesada-(S, 3xG4S/T)-645dsvH (SEQ ID NO: 1)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT NYGIHWIRQA PGKGLEWVAS ISPSGGLTTY
 RDSVKGRFTI SRDDAKNSPY LQMNSLRAED TAVYYCATGG EGIFDYWGQG TLVTVSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC SGGGSGGGG TGGGGSEVQL
 LESGGGLVQP GGSLRLSCAV SGIDLSNYAI NWRQAPGKC LEWIGIIWAS GTTFYATWAK
 GRFTISRDNS KNTVYLQMNS LRAEDTAVYY CARTVPGYST APYFDLWGQG
 TLVTVSS

A26 Fab ligera-(S, 3xG4S)-645dsvL (SEQ ID NO: 2)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRATQSIY NALAWYQQKP GKAPKLLIYN ANTLHTGVPS
 RFSASGSGTD STLTISLQP EDFATYYCQQ YYDYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPS VFIFPP
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECSGGGGS GGGSGGGGS DIQMTQSPSS
 VSASVGDRVT ITCQSSPSVW SNFLSWYQQK PGKAPKLLIY EASKLTSGVP SRFSGSGSGT
 DFTLTISLQ PEDFATYYCG GGYSSISDTT FCGGTKVEIK RT

Figura 1B A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL)

A26 Fab pesada (SEQ ID NO: 3)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT NYGIHWIRQA PGKGLEWVAS ISPSGGLTTY
 RDSVKGRFTI SRDDAKNSPY LQMNSLRAED TAVYYCATGG EGIFDYWGQG TLVTVSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC

645dsvH (SEQ ID NO: 4)

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAVSGIDLS NYAINWVRQA PGKCLEWIGI IWASGTTFYA
 TWAKGRFTIS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCARTVP GYSTAPYFDL WGQGTTLVTVSS

A26 Fab ligera-(S, 3xG4S)-645dsvL (SEQ ID NO: 5)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRATQSIY NALAWYQQKP GKAPKLLIYN ANTLHTGVPS
 RFSASGSGTD STLTISLQP EDFATYYCQQ YYDYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPS VFIFPP
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECSGGGGS GGGSGGGGS DIQMTQSPSS
 VSASVGDRVT ITCQSSPSVW SNFLSWYQQK PGKAPKLLIY EASKLTSGVP SRFSGSGSGT
 DFTLTISLQ PEDFATYYCG GGYSSISDTT FCGGTKVEIK RT

Figura 1C A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH)

A26 Fab pesada-(S, 3xG4S/T)-645dsvH

(SEQ ID NO: 6)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT NYGIHWIRQA PGKGLEWVAS ISPSGGLTYY
 RDSVKGRFTI SRDDAKNSPY LQMNSLRAED TAVYYCATGG EGIFDYWGQG TLVTVSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC SGGGGSGGGG TGGGGSEVQL
 LESGGGLVQP GGSLRLSCAV SGIDLSNYAI NWVRQAPGKC LEWIGIIWAS GTTFYATWAK
 GRFTISRDNS KNTVYLQMNS LRAEDTAVYY CARTVPGYST APYFDLWGQG TLVTVSS

A26 Fab ligera

(SEQ ID NO: 7)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRATQSIY NALAWYQQKP GKAPKLLIYN ANTLHTGVPS
 RFSASGSGTD STLTISLQP EDFATYYCQQ YYDYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

645dsvL

(SEQ ID NO: 8)

DIQMTQSPSS VSASVGDRVT ITCQSSPSVW SNFLSWYQQK PGKAPKLLIY EASKLTSGVP
 SRFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFATYYCG GGYSSISDTT FGCGTKVEIK RT

Figura 1D A26Fab-645dsscFv (HC-scFv)

A26 Fab pesada-(S, 2xG4S/T)-645dsscFv(vH-4xG4S-vL) (SEQ ID NO: 9)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT NYGIHWIRQA PGKGLEWVAS ISPSGGLTYY
 RDSVKGRFTI SRDDAKNSPY LQMNSLRAED TAVYYCATGG EGIFDYWGQG TLVTVSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC SGGGGTGGGG SEVQLLES
 GLVQPGGSLR LSCAVSGIDL SNYAINWVRQ APGKCLEWIG IIWASGTTFY ATWAKGRFTI
 SRDNSKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCARTV PGYSTAPYFD LWGQGLTVTV SSGGGGSGGG
 GSGGGGSGGG GSDIQMTQSP SSVSASVGDR VTITCQSSPS VWSNFLSWYQ QKPGKAPKLL
 IYEASKLTSG VPSRFSGSGS GTDFTLTISS LQPEDFATYY CGGGYSSISD TTFGCGTKVE
 IKRT

A26 Fab ligera

(SEQ ID NO: 10)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRATQSIY NALAWYQQKP GKAPKLLIYN ANTLHTGVPS
 RFSASGSGTD STLTISLQP EDFATYYCQQ YYDYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Figura 1E A26Fab-645dsscFv (LC-scFv)

A26 Fab pesada

(SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISR
DDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSC

A26 Fab ligera-(S, 2xG4S)-645dsscFv(vH-4xG4S-vL)

(SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDST
LTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG
GGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGI IWASGTTFYATWA
KGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDITTFGCGTKVEIKRT

Figura 1F

Fab LC

(SEQ ID NO: 81)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDST
LTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab-648gH1 HC

(SEQ ID NO: 82)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISR
DDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCSGGGGSGGGGTGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLRYAMTWVRQAPGKCLEWIGTIT
TGGNTNYANWAKGRFTISKDSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYVSYADATELSLWGQGLTVTVSS

648gL1

(SEQ ID NO: 83)

DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSLAWYQQKPGKAPKLLIYYASTVASGVPSRFRKSGSGTEFT
LTISLQPDDEFATYYCQSYDYSSSSSYAFGCGTKVEIKRT

Fab HC

(SEQ ID NO: 84)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISR
DDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSC

Fab-648gL1 LC

(SEQ ID NO: 85)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDST
LTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG
GGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSLAWYQQKPGKAPKLLIYYASTVASGV
PSRFRKSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQSYDYSSSSSYAFGCGTKVEIKRT

648gH1

(SEQ ID NO: 86)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLRYAMTWVRQAPGKCLEWIGTITGGNTNYANWAKGRFTISKD
STTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYVSYADATELSLWGQGLTVTVSS

Figura 1G

645H

CDRH1: GIDLSNYAIN (SEQ ID NO:87)
CDRH2: IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO:88)
CDRH3: TVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO:89)

645L

CDRL1: QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO:90)
CDRL2: EASKLTS (SEQ ID NO:91)
CDRL3: GGGYSSISDTT (SEQ ID NO:92)

648H

CDRH1: GFSLSR YamT (SEQ ID NO:93)
CDRH2: TITTGGNTNYANWAKG (SEQ ID NO:94)
CDRH3: GGYVSYADATELSL (SEQ ID NO:95)

648L

CDRL1: QASQSIGSRLA (SEQ ID NO:96)
CDRL2: YASTVAS (SEQ ID NO:97)
CDRL3: QSYDYSSSSSYA (SEQ ID NO:98)

(a) Dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo antialbúmina(no ds) (SEQ ID NO:99)

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDN SKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(b) Dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo antialbúmina(ds) (SEQ ID NO:100)

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDN SKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(c) Dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo antialbúmina (no ds) (SEQ ID NO:101)

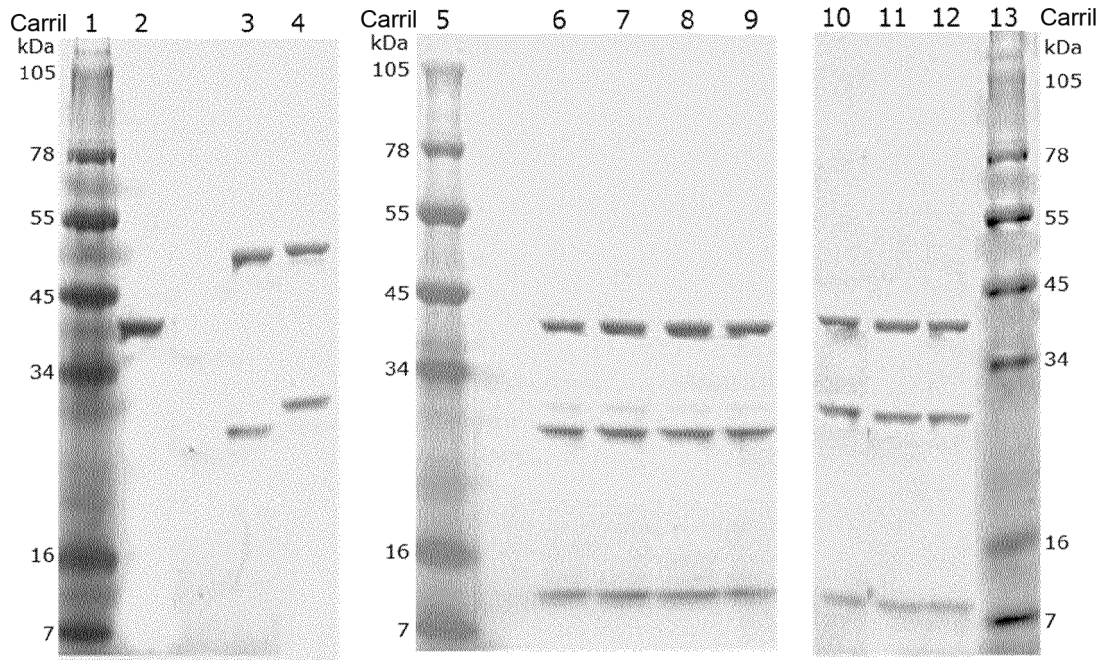
DIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQ
PEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKVEIKRT

(d) Dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo antialbúmina (ds) (SEQ ID NO:102)

DIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQ
PEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIKRT

Figura 2

SDS-PAGE reductor de A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsscFv y A26Fab-645dsFv de conector único purificados con proteína G y expresados por células HEK293



Carril Muestra

- 1 Marcadores de peso molecular Seeblue Plus 2
- 2 A26Fab-645dsFv
- 3 A26Fab-645dsscFv (LC-scFv)
- 4 A26Fab-645dsscFv (HC-scFv)
- 5 Marcadores de peso molecular Seeblue Plus 2
- 6 A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:1:1)
- 7 A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:1:2)
- 8 A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 2:1:2)
- 9 A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL) (proporción LC-vL:HC:vH 1:2:2)
- 10 A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 1:1:1)
- 11 A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 1:1:2)
- 12 A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH) (proporción HC-vH:LC:vL 2:1:2)
- 13 Marcadores de peso molecular Seeblue Plus 2

Figura 3

Análisis de G3000 SEC-HPLC de A26Fab-645dsFv, A26Fab-645dsscFv y A26Fab-645dsFv de conector único purificados con proteína G y expresados por células HEK293

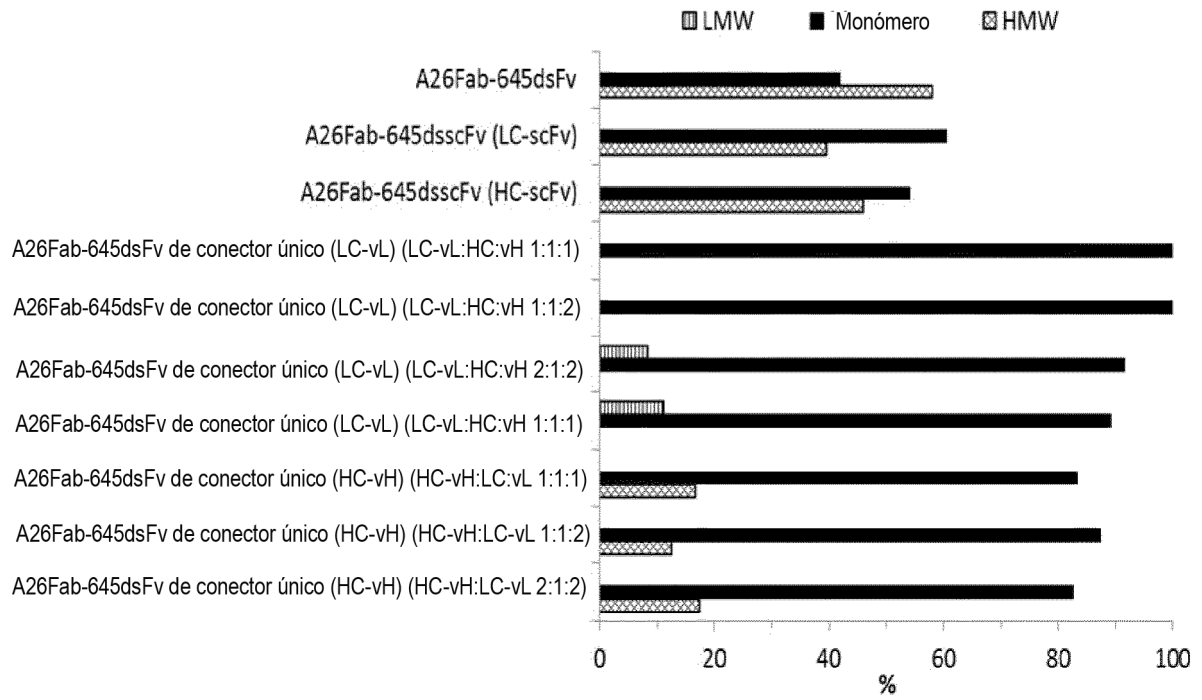
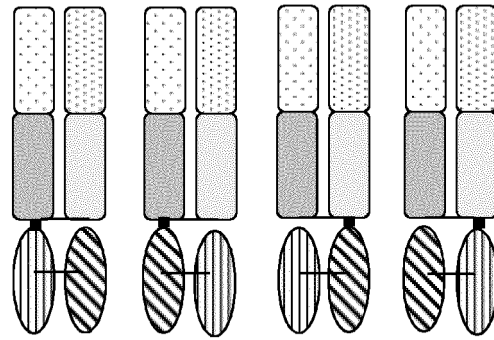



Figura 4





V_1 y V_2 Dominio variable de cadena ligera  o dominio variable de cadena pesada 

Conector(X) ■

— Enlace disulfuro

Región variable de cadena ligera (VL) 

Región variable de cadena pesada (VH) 

Región constante cKappa (C_L) 


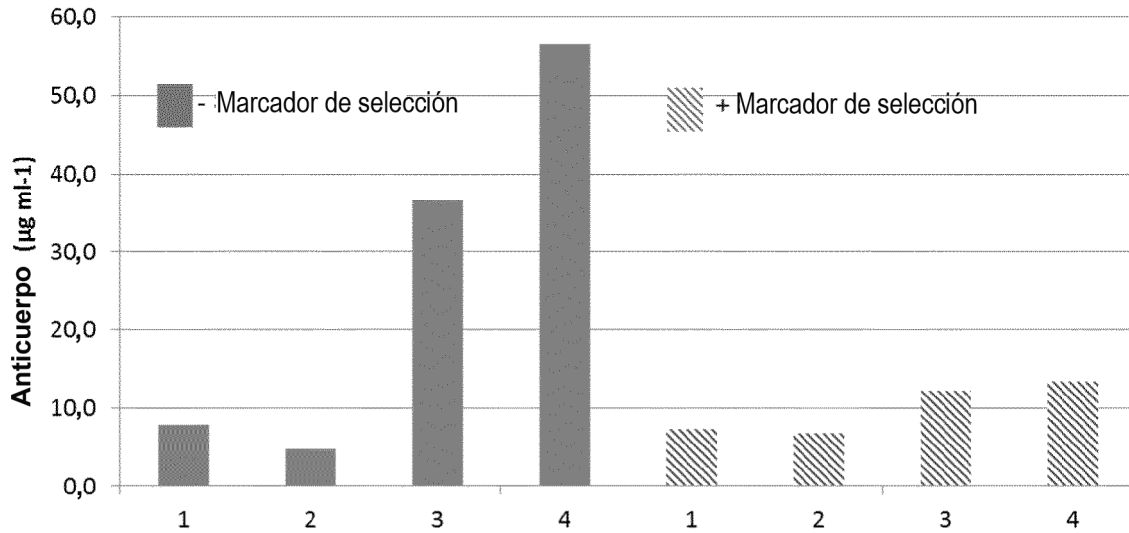
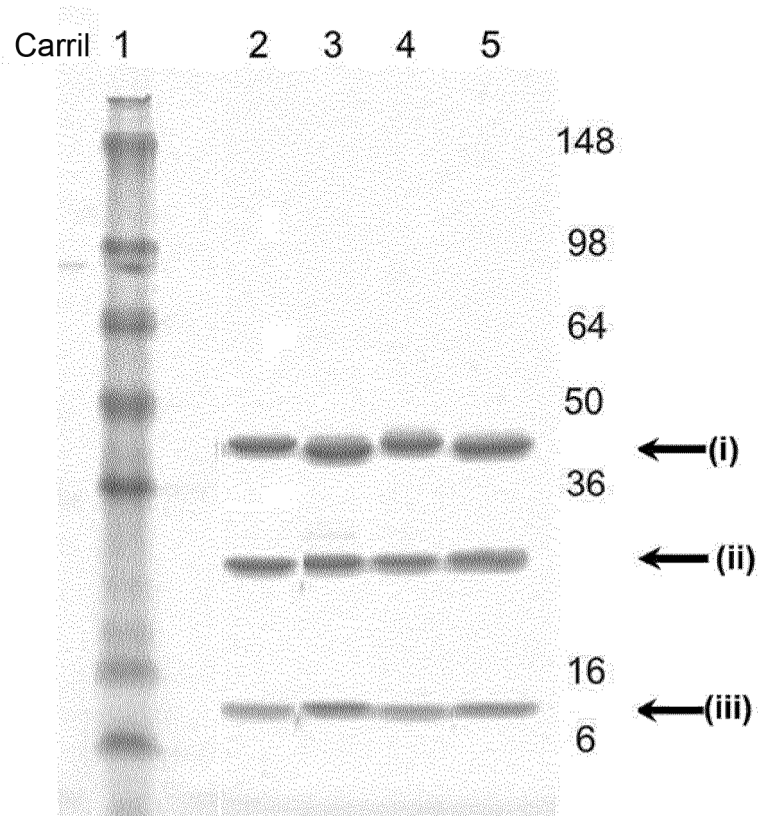
Región constante (CH_1) 

Figura 5 Expresión transitoria de A26Fab-dsFv expresados a partir de plásmidos de triple gen en células CHO



Columna	Muestra
1	A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH)
2	A26Fab-648dsFv de conector único (conectado HC-vH)
3	A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL)
4	A26Fab-648dsFv de conector único (conectado LC-vL)

Figura 6 SDS-PAGE reductor de A26Fab-645dsFv y A26Fab-648dsFv de conector único purificados con proteína G expresados a partir de plásmidos de triple gen en células CHO

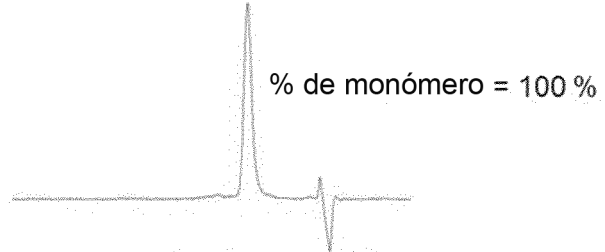


Carril	Muestra
1	Marcador de proteínas Seeblue 2
2	A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH)
3	A26Fab-648dsFv de conector único (conectado HC-vH)
4	A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL)
5	A26Fab-648dsFv de conector único (conectado LC-vL)

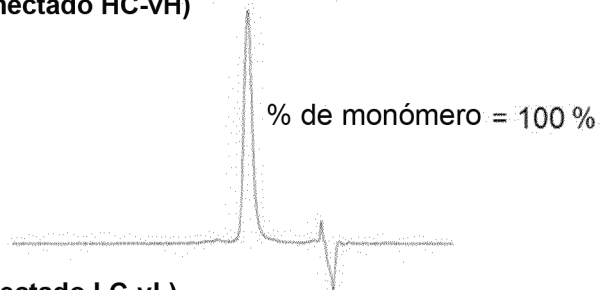
en la que (i) A26Fab ligera pesada conectada a 645vL o 648vL (M_r , aproximadamente 36 kDa) o A26Fab ligera pesada conectada a 645vH o 648vH (M_r , aproximadamente 37 kDa); (ii) A26Fab ligera (M_r , aproximadamente 24 kDa) o A26Fab pesada (M_r , aproximadamente 24 kDa); (iii) 645vL, 648vL, 645vH o 648vH (M_r , aproximadamente 12-13 kDa).

Figura 7 Análisis de G3000 SEC-HPLC de A26Fab-645dsFv de conector único y A26Fab-648dsFv de conector único purificados con proteína G expresados a partir de plásmidos de triple gen en células CHO

A26Fab-645dsFv de conector único (conectado HC-vH)



A26Fab-648dsFv de conector único (conectado HC-vH)



A26Fab-645dsFv de conector único (conectado LC-vL)



A26Fab-648dsFv de conector único (conectado LC-vL)

