

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 649**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/24	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2010 PCT/GB2010/001803**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011 WO11036460**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2010 E 10761060 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2480577**

54 Título: **Anticuerpos multivalentes estabilizados con disulfuro**

30 Prioridad:

25.09.2009 WO PCT/GB2009/002310
25.03.2010 GB 201005063

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ADAMS, RALPH;
HANCOCK, LAURA y
HEYWOOD, SAM PHILIP

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 736 649 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos multivalentes estabilizados con disulfuro

La presente invención se refiere a nuevas proteínas de fusión de anticuerpos de especificidad dual. Estos anticuerpos comprenden una primera especificidad por un antígeno de interés, y una segunda especificidad por un segundo antígeno de interés, por ejemplo, una proteína portadora sérica para su uso en la extensión de su semivida sérica *in vivo*. También se proporcionan métodos para la producción de dichas moléculas y composiciones farmacéuticas que las comprenden.

La alta especificidad y afinidad de los anticuerpos los hacen agentes de diagnóstico y terapéuticos ideales, concretamente para modular las interacciones proteína:proteína. Los avances en la tecnología de anticuerpos recombinantes han dado como resultado la producción de fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂ y otros fragmentos de anticuerpos. Estas moléculas más pequeñas conservan la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos completos y también pueden mostrar una mejor penetración en los tejidos y propiedades farmacocinéticas, en comparación con las moléculas de inmunoglobulina completas. En efecto, los fragmentos de anticuerpos están demostrando ser agentes terapéuticos versátiles, tal como se observa por el reciente éxito de productos tales como ReoPro® y Lucentis®. Aunque dichos fragmentos parecen mostrar una serie de ventajas frente a las inmunoglobulinas completas, también tienen el inconveniente de presentar una mayor velocidad de eliminación del suero, puesto que carecen del dominio Fc que imparte una vida larga *in vivo* (Medasan *et al.*, 1997, J. Immunol., 158:2211-2217).

Los anticuerpos con especificidad dual, es decir, que se unen a dos antígenos diferentes, han sido previamente descritos (para unos análisis, véase Segal *et al.*, 1999, Curr. Opin. Immunol., 11:558-562; Plückerthun y Pack, 1997, Immunotechnology, 3:83-105; Fischer y Leger, 2007, Pathobiology, 74, 3-14). Los anticuerpos de especificidad dual también se describen en los documentos WO02/02773, US2007065440, US2006257406, US2006106203 y US2006280734. Las estrategias previas para preparar moléculas basadas en anticuerpos heterobiespecíficos han empleado, en general, técnicas de entrecruzamiento químico o de modificación de proteínas. El entrecruzamiento químico ofrece bajos rendimientos de formación de hetero- y homodímeros y es necesaria su posterior separación cromatográfica. Las estrategias de modificación de proteínas son muy complejas (por ejemplo, modificación con la técnica de botón en ojal; Ridgway *et al.*, 1996, Protein Eng., 9(7):617-621) o emplean moléculas con características de estabilidad inapropiadas (por ejemplo, diacuerpos, scFv). En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos también pueden presentar problemas de impedimentos estéricos, de modo que ambos antígenos no pueden unirse simultáneamente a cada brazo del anticuerpo.

El documento WO2007/109254 describe Fv monocatenarios estabilizados por un enlace disulfuro y moléculas que los comprenden. Schmiel *et al.*, Protein Engineering, vol. 13, n.º 10, 1 de octubre, 200, pp. 725 a 734, trata de la expresión de un fragmento de anticuerpo bc-Fv-bcFv biespecífico en *E. coli*. El documento WO2009/040562 describe una molécula de Fab unida a dos anticuerpos de dominio único.

Los anticuerpos de dominio variable único, que también se denominan anticuerpos de dominio único o dAb, se corresponden con las regiones variables de la cadena pesada (VH) o ligera (VL) de un anticuerpo. Se han descrito anticuerpos de dominio único murinos en Ward *et al.*, 1989, Nature, 341, 544-546. También se han descrito anticuerpos de dominio único humanos y humanos 'camelizados' (Holt *et al.*, 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490). También se han obtenido anticuerpos de dominio único de camélidos (camellos y llamas) y peces cartilaginosos (tiburones alfombra y nodriza). Estos organismos han desarrollado dominios únicos similares a V de alta afinidad (denominados VhH en camélidos y V-NAR en tiburones), montados en un marco de dominio constante equivalente a Fc como componente integral y fundamental de su sistema inmunológico (véase Holliger y Hudson, para un análisis; 2005, Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136).

Se han descrito fusiones de enzima-anticuerpo de dominio único en el documento EP0368684. También se han descrito fusiones de grupo efector-dominio único en el documento WO2004/058820 que comprenden un único dominio variable. Se han descrito inmunoglobulinas de dominio variable duales en el documento WO2007/024715. Se han descrito ligandos específicos duales que comprenden dos anticuerpos de dominio único con diferentes especificidades en el documento EP1517921.

Se conocen medios para mejorar la semivida de fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ y otros fragmentos de anticuerpos. Una estrategia ha consistido en conjugar el fragmento a moléculas poliméricas. Así, los fragmentos de semivida corta en la circulación Fab', F(ab')₂ en animales han mejorado por medio de la conjugación a polietilenglicol (PEG; véanse, por ejemplo, los documentos WO98/25791, WO99/64460 y WO98/37200). Otra estrategia ha consistido en modificar el fragmento de anticuerpo mediante su conjugación con un agente que interacciona con el receptor FcRn (véase, por ejemplo, el documento WO97/34631). Otra estrategia para extender la semivida ha consistido en emplear polipéptidos que se unen a la albúmina del suero (véase, por ejemplo, Smith *et al.*, 2001, Bioconjugate Chem., 12:750-756; documento EP0486525; documento US6267964; documento WO04/001064; documento WO02/076489; y documento WO01/45746). Sin embargo, aún es necesario producir proteínas de inmunoglobulinas de unión a antígenos que tengan una semivida larga *in vivo*, como alternativa a las que poseen una semivida larga porque interaccionan con el receptor FcRn, sin que deban modificarse químicamente

por medio de una conjugación con PEG, o por medio de su conjugación con la albúmina del suero humana.

En el plasma existe una diversidad de proteínas y estas incluyen la proteína de unión a tiroxina, la transtiretina, la glicoproteína ácida- α 1, la transferrina, el fibrinógeno y la albúmina, o cualquiera de sus fragmentos. Las proteínas portadoras séricas circulan dentro del cuerpo con unas semividas medidas en días, por ejemplo, 5 días para la proteína de unión a tiroxina, o 2 días para la transtiretina (Bartalena y Robbins, 1993, Clinics in Lab. Med., 13:583-598), o 65 horas en la segunda fase de recambio de la glicoproteína ácida- α 1 yodada (Bree *et al.*, 1986, Clin. Pharmacokin., 11:336-342). Los datos de Gitlin *et al.* (1964, J. Clin. Invest., 10:1938-1951) sugieren que, en mujeres embarazadas, la semivida de la glicoproteína ácida- α 1 es de 3,8 días, 12 días para la transferrina y 2,5 días para el fibrinógeno. La albúmina del suero es una proteína abundante en los compartimentos vasculares y extravasculares, con una semivida en el ser humano de aproximadamente 19 días (Peters, 1985, Adv. Protein Chem., 37:161-245). Esto resulta similar a la semivida de IgG1, que es de aproximadamente 21 días (Waldeman y Strober, 1969, Progr. Allergy, 13:1-110).

La presente descripción proporciona una proteína de fusión de anticuerpo multivalente que consiste en un fragmento Fab o Fab', con una primera especificidad por un antígeno de interés, y dos anticuerpos de dominio único (dAb) que son una pareja de VH/VL con especificidad por un segundo antígeno de interés, en la que los dos anticuerpos de dominio único están unidos mediante un enlace disulfuro entre dos restos cisteína, uno en VH y otro en VL, en la que la posición de los dos restos cisteína es VH44 y VL100, según la numeración de Kabat, y en la que el V_H de dAB está conectado directa o indirectamente con el C-terminal de la cadena pesada del Fab o Fab' mediante una fusión genética, y el V_L de dAB está conectado directa o indirectamente con el C-terminal de la cadena ligera del Fab o Fab' mediante una fusión genética.

Un anticuerpo de dominio único, tal como se emplea en la presente, no se refiere a un Fv monocatenario. Un Fv monocatenario se caracteriza por dos dominios variables que están unidos entre sí, formando con ello una entidad independiente, o están unido a otra entidad a través de solo uno de sus dominios variables.

Multivalente, tal como se emplea en la presente, significa una entidad que presenta dos o más sitios de unión, por ejemplo, dos o tres sitios de unión, tal como dos sitios de unión. Cada sitio de unión puede unirse al mismo epitopo o a diferentes epitopos sobre el mismo antígeno, o puede unirse a antígenos diferentes (diferenciados).

Una fusión de anticuerpo de especificidad dual de la invención será capaz de unirse selectivamente a dos antígenos de interés.

En una realización, el primer y el segundo antígeno son el mismo antígeno.

En una realización, un antígeno de interés unido por el fragmento Fab o Fab' puede ser una proteína asociada a una célula, por ejemplo, una proteína de la superficie celular sobre células, tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína importante desde el punto de vista médico, tales como las proteínas sobrerreguladas durante una enfermedad o 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 integrinas β 1, 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 leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC de clase I y MHC de clase II, y VEGF, y sus receptores, cuando resulte apropiado.

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, antígenos víricos, por ejemplo, antígenos del virus respiratorio sincitial o citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones, tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF o GM-CSF, y factores del crecimiento derivados de plaquetas, tales como PDGF- α , y PDGF- β y sus receptores, cuando resulte apropiado. Otros antígenos incluyen antígenos de la superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus, tales como gripe, EBV, HepA, B y C, agentes de terrorismo biológico, radionúclidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

En un ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción 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, directa o indirectamente.

En un ejemplo, un segundo antígeno de interés unido por el anticuerpo o anticuerpos de dominio único en las proteínas de fusión de anticuerpos de especificidad dual de la descripción puede ser 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, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína importante desde el punto de vista médico, tales como las proteínas sobrerreguladas durante una enfermedad o 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 integrinas $\beta 1$, 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 leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC de clase I y MHC de clase II, y VEGF, y sus receptores, cuando resulte apropiado.

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, antígenos víricos, por ejemplo, antígenos del virus respiratorio sincitial o citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones, tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF o GM-CSF, y factores del crecimiento derivados de plaquetas, tales como PDGF- α , y PDGF- β y sus receptores, cuando resulte apropiado. Otros antígenos incluyen antígenos de la superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus, tales como gripe, EBV, HepA, B y C, agentes de terrorismo biológico, radionúclidos y metales pesados, y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

Otros antígenos que pueden ser unidos por el anticuerpo o anticuerpos de dominio único incluyen proteínas portadoras séricas, polipéptidos que permiten el reclutamiento de funciones efectoras mediado por células y proteínas quelantes de núclidos.

Así, en un ejemplo, la presente descripción proporciona proteínas de fusión de anticuerpos de especificidad dual que comprenden un resto de inmunoglobulina con una primera especificidad por un antígeno de interés y que comprenden además un anticuerpo de dominio único con especificidad por una segunda proteína, y esta última proporciona la capacidad de reclutar funciones efectoras, tales como la activación de la vía del complemento y/o el reclutamiento de células efectoras. Además, las proteínas de fusión de la presente descripción pueden emplearse para quelar radionúclidos en virtud de un anticuerpo de dominio único que se une a una proteína quelante de núclidos. Estas proteínas de fusión pueden utilizarse en la formación de imágenes o en estrategias de transporte dirigido de radionúclidos en terapias.

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual aislada que comprende un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con al menos dAb que posee especificidad por un polipéptido de reclutamiento, y dicho dAb proporciona la capacidad de reclutar una o más funciones efectoras mediadas por células, directa o indirectamente, mediante la unión a dicho polipéptido de reclutamiento.

El reclutamiento de funciones efectoras puede ser directo, porque dicha función efectora esté asociada con una célula y dicha célula porta una molécula de reclutamiento sobre su superficie. El reclutamiento indirecto puede producirse cuando la unión de un dAb a una molécula de reclutamiento provoque la liberación, por ejemplo, de un factor que, a su vez, puede reclutar, directa o indirectamente, funciones efectoras, o puede producirse a través de la activación de una vía de señalización. Los ejemplos incluyen TNF α , IL2, IL6, IL8, IL17, IFN γ , histamina, C1q, opsonina y otros miembros de las cascadas de activación del complemento clásicas y alternativas, tales como C2, C4, C3-convertasa, y C5 a C9.

Tal como se emplea en la presente, un 'polipéptido de reclutamiento' incluye un Fc γ R, tal como Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, una proteína de la vía del complemento, tal como, pero sin limitarse a C1q y C3, una proteína marcadora de CD (marcador de la agrupación de diferenciación), 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 de reclutar una función efectora mediada por células, directa o indirectamente. Un polipéptido de reclutamiento también incluye moléculas de inmunoglobulina, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE e IgA, que posean una función efectora.

En un ejemplo, la segunda proteína por la cual el dAb presenta especificidad es una proteína de la vía del complemento, siendo C1q particularmente preferida.

En un ejemplo preferido, la segunda proteína por la cual el dAb presenta especificidad es una proteína marcadora de CD, siendo CD68, CD80, CD86, CD64, CD3, CD4, CD8 CD45, CD16 y CD35 particularmente preferidas.

Por consiguiente, también se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual aislada que

comprende un fragmento de anticuerpo con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con al menos un dAb que presenta especificidad por una molécula de CD seleccionada del grupo que consiste en CD68, CD80, CD86, CD64, CD3, CD4, CD8 CD45, CD16 y CD35.

5 En un ejemplo, el anticuerpo o anticuerpos de dominio único proporcionan una semivida extendida al resto de inmunoglobulina con la primera especificidad.

10 Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual que comprende un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con al menos un anticuerpo de dominio único que presenta especificidad por una proteína portadora sérica, una molécula de inmunoglobulina de la circulación, o CD35/CR1, y dicho anticuerpo de dominio único proporciona una semivida extendida al fragmento de anticuerpo con especificidad por dicho antígeno de interés por medio de su unión a dicha proteína portadora sérica, molécula de inmunoglobulina de la circulación o CD35/CR1.

15 En un ejemplo se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual aislada que comprende un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con al menos un anticuerpo de dominio único que presenta especificidad por una proteína portadora sérica, una molécula de inmunoglobulina de la circulación, o CD35/CR1, y dicho anticuerpo de dominio único proporciona una semivida extendida al fragmento de anticuerpo con especificidad por dicho antígeno de interés por medio de su unión a dicha proteína portadora sérica, molécula de inmunoglobulina de la circulación o CD35/CR1.

20 Tal como se emplea en la presente, las 'proteínas portadoras séricas' incluyen la proteína de unión a tiroxina, la transtiretina, la glicoproteína ácida- α 1, la transferrina, el fibrinógeno y la albúmina, o cualquiera de sus fragmentos.

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

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

25 En un ejemplo preferido, la segunda proteína por la cual el dAb presenta especificidad es una proteína portadora sérica, siendo particularmente preferida una proteína portadora sérica humana. En un ejemplo más preferido, la proteína portadora sérica es la albúmina del suero humana.

30 Por consiguiente, se proporciona una proteína de fusión de anticuerpo con especificidad dual que comprende un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con al menos un anticuerpo de dominio único que presenta especificidad por la albúmina del suero humana.

35 En un aspecto, la presente descripción proporciona una proteína de fusión de anticuerpo con especificidad dual aislada que comprende un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con al menos un anticuerpo de dominio único que presenta especificidad por la albúmina del suero humana.

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

Así, en un ejemplo más preferido, las proteínas de fusión de anticuerpos de la invención son proteínas de fusión de traducción, es decir, fusiones genéticas, siendo codificadas cada una de sus secuencias por un vector de expresión.

40 En un ejemplo, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o modificada. Cuando el fragmento de anticuerpo que se va a emplear para preparar la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la invención es un fragmento Fab', dicho fragmento se extiende, en general, en el extremo C-terminal de la cadena pesada por medio de uno o más aminoácidos. Por tanto, una fusión de anticuerpo de la descripción puede comprender un fragmento Fab' condensado por traducción (o químicamente condensado) con un dAb, directamente o a través de un conector. Además, los ejemplos de fragmentos de anticuerpo Fab' adecuados incluyen los descritos en los documento WO2005/003170 y WO2005/003171.

45 En otro ejemplo, los fragmentos de anticuerpos son fragmentos Fab. Así, una fusión de anticuerpo de la descripción puede comprender un fragmento Fab condensado por traducción (o químicamente condensada) con una secuencia de conector que, a su vez, está condensada por traducción (o químicamente condensado) a un dAb. Preferiblemente, el fragmento Fab es un fragmento Fab que termina en las cisteínas intercatenarias, tal como se describe en el documento WO2005/003169. Por consiguiente, en un ejemplo, el fragmento Fab termina en la posición 233 de IgG1.

50 Los fragmentos de anticuerpo Fab o Fab' para su uso en la presente invención pueden proceder de cualquier especie, pero preferiblemente se derivan de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, o son fragmentos

humanizados. Un fragmento de anticuerpo para su uso usado en la presente invención puede proceder de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina, y puede obtenerse de cualquier especie, que incluye, por ejemplo, ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano.

- 5 En un ejemplo, el fragmento de anticuerpo Fab o Fab' es un fragmento de anticuerpo monoclonal, totalmente humano, humanizado o quimérico. En un ejemplo, los fragmentos de anticuerpo Fab o Fab' son totalmente humanos o están humanizados.

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

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden ser generados utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos mediante la clonación y expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(15), 7843-7848, el documento WO 92/02551, el documento WO2004/051268 y el documento WO2004/106377.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de una especie no humana que tienen 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).

Los anticuerpos para su utilización en la presente invención también pueden ser generados utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 182, 41-50; Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 184, 177-186; Kettleborough *et al.* *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 952-958; Persic *et al.*, *Gene*, 1997 187, 9-18; y Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191-280; documento WO90/02809; documento WO91/10737; documento WO92/01047; documento WO92/18619; documento WO93/11236; documento WO95/15982; y documento WO95/20401; y documentos US5.698.426; US5.223.409; US5.403.484; US5.580.717; US5.427.908; US5.750.753; US5.821.047; US5.571.698; US5.427.908; US5.516.637; US5.780.225; US5.658.727; US5.733.743; y US5.969.108. Además, se pueden utilizar ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para generar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos totalmente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (cuando están presentes) de las cadenas pesadas y ligeras son en su totalidad de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de las regiones variables y/o constantes de la inmunoglobulina murina han sido reemplazados por sus homólogos humanos, por ejemplo, tal como se describe en términos generales en los documentos EP0546073, US5.545.806, US5.569.825, US5.625.126, US5.633.425, US5.661.016, US5.770.429, EP0438474 y EP0463151.

El material de partida del fragmento de anticuerpo Fab o Fab' para su uso en la presente invención puede obtenerse a partir de cualquier anticuerpo completo, en especial un anticuerpo monoclonal completo, empleando cualquier técnica de ruptura y/o digestión enzimática adecuada, por ejemplo, por medio de un tratamiento con pepsina. Como alternativa, o además, el material de partida de anticuerpo puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y la reexpresión del ADN que codifica las regiones variables y/o constantes del anticuerpo. Se pueden utilizar las técnicas convencionales de la biología molecular para modificar, añadir o suprimir aminoácidos o dominios según se desee. Cualquier alteración de las regiones variables o constantes aún estará incluida en los términos región 'variable' y 'constante' según se utilizan en la presente memoria.

El material de partida del fragmento de anticuerpo puede ser obtenido a partir de cualquier especie incluyendo, por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Las partes del fragmento de anticuerpo se pueden obtener de más de una especie, por ejemplo los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El material de partida del fragmento de anticuerpo también se puede modificar. En otro ejemplo, la región variable del fragmento de anticuerpo ha sido creada utilizando técnicas de modificación de ADN recombinante. Estas versiones modificadas incluyen aquellas creadas, por ejemplo, a partir de regiones variables de anticuerpos naturales por medio de inserciones, deleciones o cambios en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Los ejemplos concretos de este tipo incluyen aquellos dominios de la región variable modificados genéticamente que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos del marco de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo. Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, Boss *et al.*, documento US4.816.397; Cabilly *et al.*, documento US6.331.415; Shrader *et al.*, documento WO92/02551; Ward *et al.*, 1989, *Nature*, 341, 544; Orlandi *et al.*, 1989,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 322, 323; Bird *et al.*, 1988, Science, 242, 423; Queen *et al.*, documento US5.585.089; Adair, documento WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

5 En la presente invención, cada anticuerpo de dominio único condensado con el fragmento Fab o Fab' puede estar unido directamente o a través de un conector.

Unido directamente, tal como se emplea en la presente, significa que el "último" aminoácido del Fab o Fab' está unido a través de un enlace peptídico al "primer" aminoácido del anticuerpo de dominio único (o viceversa)

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

Tabla 1. Secuencias de conectores flexibles

SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	SGGGGSE
2	DKTHTS
3	(S)GGGGS
45	(S)GGGSGGGGS
46	(S)GGGSGGGGSGGGGS
47	(S)GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
48	(S)GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
4	AAAGSG-GASAS
5	AAAGSG-XGGGS-GASAS
49	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
50	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
51	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
6	AAAGSG-XS-GASAS
7	PGGNRGTTTTRRPATTGSSPGPTQSHY
8	ATTTGSSPGPT
9	ATTTGS
-	GS
10	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
11	GTVAAPSVFIFPPSD
12	GGGGIAPSMVGGGGS
13	GGGGKVEGAGGGGGS
14	GGGGSMKSHDGGGGS
15	GGGNLITIVGGGGS

ES 2 736 649 T3

SEQ ID NO:	SECUENCIA
16	GGGGVPSLPGGGGS
17	GGEKSIPGGGGGS
18	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
19	YPRSIYIRRRHPSPLTT
20	TPSHLSHILPSFGLPTFN
21	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
22	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
23	APGPSAPSHRSLPSRAFG
24	PRNSIHFLHPLLVA PLGA
25	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
26	SPQYPSPLTLTLPHPHSL
27	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
28	LPWRTSLLPSLPLRRRP
29	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
30	VPPAPVVSLRSAHARPPY
31	LRPTPPRVRSYTCCTP-
32	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
33	CNPLLPLCARSPAVRTFP

(S) es opcional en la secuencia 3 y 45 a 48.

Por tanto, en una realización, el conector tiene la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:224). En una realización, el conector tiene la secuencia GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:225).

5 Los ejemplos de conectores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO:34), PPPP (SEQ ID NO:35) y PPP.

Otros conectores incluyen ASTKGP (SEQ ID NO:228), TVAAP (SEQ ID NO:229).

En una realización, el conector peptídico es un péptido de unión a la albúmina. Los ejemplos de los péptidos de unión a la albúmina se proporcionan en el documento WO 2007/106120 e incluyen:

Tabla 2

SEQ ID NO:	SECUENCIA
208	DLCLRDWGCLW
209	DICLPRWGCLW
210	MEDICLPRWGCLWGD
211	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
212	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
213	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK

SEQ ID NO:	SECUENCIA
214	EDICLPRWGCLWEDD
215	RLMEDICLPRWGCLWEDD
216	MEDICLPRWGCLWEDD
217	MEDICLPRWGCLWED
218	RLMEDICLARWGCLWEDD
219	EVRSFCTRWPAAEKSCPLRG
220	RAPESFVCYWETICFERSEQ
221	EMCYFPGICWM

En un ejemplo, las moléculas de la presente invención comprenden un péptido de unión a la albúmina en una localización añadida o alternava a un conector peptídico de unión a la albúmina. *In vivo*, el péptido se une a la albúmina, lo cual aumenta la semivida de la molécula.

- 5 El péptido de unión a la albúmina puede agregarse a una o más regiones variables (por ejemplo, en el el Fab y/o en el anticuerpo/anticuerpos de dominio), una bisagra, un conector, el N-terminal o C-terminal de la molécula, o una combinación de estos, o cualquiera localización que no interfiera con las propiedades de unión al antígeno de la molécula.

10 En un ejemplo, se emplea una secuencia bisagra de anticuerpo, o una de sus partes, como conector, por ejemplo, la secuencia bisagra superior. Generalmente, los fragmentos de anticuerpo Fab' para su uso en la presente invención poseen una región bisagra nativa o modificada. Estas regiones bisagra se emplean como conector natural con el resto dAb. La región bisagra nativa es la región bisagra asociada normalmente al dominio C_H1 de la molécula de anticuerpo. Una región bisagra modificada es cualquier bisagra que difiera en longitud y/o composición de la región bisagra nativa. Estas bisagras pueden incluir regiones bisagra de otras especies, tales como regiones bisagra de ser humano, ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama o cabra. Otras regiones bisagra modificadas pueden comprender una región bisagra completa procedente de un anticuerpo de una clase o subclase diferente a la del dominio C_H1. Así pues, por ejemplo, un dominio C_H1 de clase γ 1 podría estar conectado a una región bisagra de clase γ 4. Como alternativa, la región bisagra modificada puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad de repetición en la que cada unidad de la repetición procede de una región bisagra natural. En otra alternativa, se puede alterar la región bisagra natural al convertir una o varias cisteínas u otros restos en restos neutros, tales como alanina, o al convertir los restos colocados idóneamente en restos cisteína. Mediante tales medios, se puede incrementar o disminuir el número de restos cisteína de la región bisagra. Además se pueden controlar otras características de la bisagra, tales como la distancia de las cisteínas de la bisagra desde la cisteína intercatenaria de la cadena ligera, la distancia entre las cisteínas de la bisagra y la composición de otros aminoácidos de la bisagra que pueden afectar a las propiedades de la bisagra tales como la flexibilidad, por ejemplo, se pueden incorporar glicinas a la bisagra para aumentar la flexibilidad rotacional o se pueden incorporar prolinas para reducir la flexibilidad. Como alternativa, pueden incorporarse combinaciones de restos cargados o hidrófobos en la bisagra para conferir propiedades de multimerización; véase, por ejemplo, Richter *et al.*, 2001, Prot. Eng., 14(10):775-783, para el uso de colas cargadas o iónicas, por ejemplo, colas ácidas como conectores, y Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol., 5(1):1547-1553 para secuencias de cremallera de leucina. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser completamente sintéticas y se pueden diseñar para que posean propiedades deseadas tales como longitud, composición y flexibilidad.

35 Se han descrito una serie de regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US5.677.425, US6642356, WO9915549, WO2005003170, WO2005003169, WO2005003170, WO9825971 y WO2005003171. Estas bisagras en general surgen de la región CH1, pero también pueden incorporarse en el extremo de la región constante de un fragmento kappa o lambda de cadena ligera; véase la tabla 3 para ejemplos.

Tabla 3. Secuencias conectoras bisagra

SEQ ID NO:	SECUENCIA
36	DKTHTCAA
37	DKTHTCPPCPA

SEQ ID NO:	SECUENCIA
38	DKTHTCPPCPATCPPCPA
39	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
40	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
41	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
42	DKTHTCCVECPA
43	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
44	DKTHTCPSCPA

Los dominios variables únicos, también denominados anticuerpos de dominio único o dAb, para su uso en la presente invención, pueden generarse empleando métodos conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en el documento WO2005/118642, Ward *et al.*, 1989, Nature, 341, 544-546, y Holt *et al.*, 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490. En una realización, un anticuerpo de dominio único para su uso en la presente invención es un dominio variable de cadena pesada (VH) o un dominio de cadena ligera (VL). Cada dominio de cadena ligera puede pertenecer al subgrupo kappa o lambda. En la técnica se han descrito métodos para aislar los dominios VH y VL; véase, por ejemplo, el documento EP0368684, y Ward *et al.*, *supra*. Estos dominios pueden proceder de cualquier especie adecuada o material de partida de anticuerpo. El anticuerpo de dominio único puede derivarse de un roedor, un ser humano u otra especie. En un ejemplo, el anticuerpo de dominio único está humanizado.

En un ejemplo, el anticuerpo de dominio único se deriva de un banco de presentación en fagos, empleando los métodos descritos, por ejemplo, en el documento WO2005/118642, Jespers *et al.*, 2004, Nature Biotechnology, 22, 1161-1165, y Holt *et al.*, 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490. Preferiblemente, estos anticuerpos de dominio único son totalmente humanos, pero también pueden proceder de otras especies. En un ejemplo, el dominio variable único es quimérico, puesto que el marco es de origen humano o sustancialmente humano, y la CDR o las CDR son de origen no humano. Se apreciará que la secuencia del anticuerpo de dominio único, después de ser aislada, puede modificarse para mejorar las características del anticuerpo de dominio único, por ejemplo, la solubilidad, tal como se describe en Holt *et al.*, *supra*.

Sustancialmente humano, tal como se emplea en la presente, significa que se conserva el carácter humano del material original, que puede ser importante para la inmunogenicidad. Un material sustancialmente humano incluiría un material en el que un aminoácido en la secuencia de marco se añade, se deleta o se sustituye por otro aminoácido.

En un ejemplo, el dAb es una secuencia humana obtenida de una presentación en fagos de scFv o de un ratón transgénico Humouse™ o Velocimouse™ o de un roedor humanizado.

En un ejemplo, el dAb se obtiene a partir de un ser humano o roedor humanizado, un camélido o un tiburón. Este dAb preferiblemente estará humanizado. En un ejemplo, el anticuerpo de dominio único es un dominio VHH basado en inmunoglobulinas de camélido, tal como se describe en el documento EP0656946. En un ejemplo, un camello o una llama se inmuniza con un antígeno de interés y se recoge sangre cuando la titulación sea la apropiada. El gen que codifica el dAb puede clonarse mediante PCR de una sola célula, o la célula o células B que codifican el dAb pueden inmortalizarse por medio de una transformación con EBV, o mediante fusión con una línea de células inmortales.

Tal como se describió anteriormente en la presente, la presente descripción proporciona proteínas de fusión de anticuerpos de especificidad dual que comprenden un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con al menos un anticuerpo de dominio único, directamente o a través de un conector, que presenta especificidad por un segundo antígeno de interés.

El fragmento de anticuerpo Fab o Fab' se condensa en el extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera con un dAb, directamente o a través de un conector. En otro aspecto, las cadenas pesada y ligera del fragmento de anticuerpo Fab o Fab' se condensan cada una en el extremo C-terminal con un dAb, directamente o a través de un conector. El enlace puede ser una conjugación química, pero, lo más preferiblemente, es una fusión de traducción, es decir, una fusión genética en la que la secuencia de cada uno está codificada en secuencia por un vector de expresión.

Generalmente, el extremo N-terminal del anticuerpo de dominio único estará condensado con el extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera del fragmento Fab o Fab', directamente o a través de un conector, y cuando el

anticuerpo de dominio único está condensado al extremo N-terminal del Fab o Fab', se condensará a través de su extremo C-terminal, opcionalmente a través de un conector.

5 En un ejemplo, la descripción proporciona una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual que comprende o que consiste en un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con un anticuerpo de dominio único en el extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera que presenta especificidad por un segundo antígeno de interés.

10 La presente descripción proporciona una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual que comprende o que consiste en un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con un anticuerpo de dominio único en el extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera que presenta especificidad por un segundo antígeno de interés.

15 En un aspecto, la presente descripción proporciona una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual que comprende o que consiste en un fragmento de anticuerpo Fab o Fab' con especificidad por un antígeno de interés, y dicho fragmento está condensado con dos anticuerpos de dominio único, en la que cada anticuerpo de dominio único está condensado con el C-terminal de la cadena ligera del fragmento Fab o Fab', y el otro anticuerpo de dominio único está condensado con el C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab', y dichos anticuerpos de dominio único juntos presentan especificidad por un segundo antígeno de interés.

20 En un aspecto, cuando las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo C-terminal, los dos anticuerpos de dominio único son idénticos, es decir, presentan la misma especificidad de unión por el mismo antígeno. En un ejemplo, se unen al mismo epitopo sobre el mismo antígeno. La presente invención incluye el caso en el que los anticuerpos de dominio único pueden ser ambos la misma VH de dAb, la misma VHH de dAb o la misma VL de dAb.

25 Las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo C-terminal, y los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al antígeno de forma cooperativa, es decir, son una pareja VH/VL complementaria que tiene la misma especificidad de unión. En un ejemplo, la pareja VH/VL es monoespecífica. Generalmente, serán una pareja VH/VL derivada del mismo anticuerpo. En un ejemplo, la pareja pareja VH/VL es una pareja de dominios variables aislados como una pareja a partir de un "banco de parejas", tal como un banco de presentación de fagos de Fab.

30 La proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención comprende dos anticuerpos de dominio único que son una pareja VH/VL complementaria, y el anticuerpo de dominio único de VH está condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena pesada (CH1), y el anticuerpo de dominio único de VL está condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena ligera (C kappa o C lambda). La descripción también incluye el caso en el que la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención comprende dos anticuerpos de dominio único que son una pareja VH/VL complementaria, y el anticuerpo de dominio único de VL está condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena pesada (CH1), y el anticuerpo de dominio único de VH está condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena ligera (C kappa o C lambda).

40 La proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención comprende dos anticuerpos de dominio único que están unidos por uno o más enlaces disulfuro tal como se define en las reivindicaciones, dos anticuerpos de dominio único que son una pareja VH/VL complementaria unida por uno o más (tal como 1 o 2) enlaces disulfuro, de modo que el anticuerpo de dominio único de VH está condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena pesada (CH1), y el anticuerpo de dominio único de VL está condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena ligera (C kappa o C lambda), y se caracteriza por la presencia de un enlace disulfuro entre dicha pareja VH/VL. Como alternativa, el anticuerpo de dominio único de VL puede estar condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena pesada (CH1), y el anticuerpo de dominio único de VH puede estar condensado con el extremo C-terminal de la región constante de cadena ligera (C kappa o C lambda), y se caracteriza por la presencia de un enlace disulfuro entre dicha pareja VH/VL.

50 En una realización, el anticuerpo de dominio único de VH está condensado con el N-terminal de la cadena pesada, y el anticuerpo de dominio único de VL está condensado con el N-terminal de la cadena ligera, y se caracteriza por la presencia de un enlace disulfuro entre dicha pareja VH/VL. Como alternativa, el anticuerpo de dominio único de VL puede estar condensado con el N-terminal de la cadena pesada, y el anticuerpo de dominio único de VH puede estar condensado con el N-terminal de la cadena ligera, y se caracteriza por la presencia de un enlace disulfuro entre dicha pareja VH/VL.

55 La presente invención proporciona una proteína de fusión de anticuerpo multivalente que comprende un fragmento Fab o Fab', con una primera especificidad por un antígeno de interés, y comprende además una pareja VH/VL con especificidad por un segundo antígeno de interés, en la que la pareja VH/VL está unida mediante un enlace disulfuro entre dos restos cisteína, uno en VH y el otro en VL, tal como se define en las reivindicaciones.

Se cree que el enlace disulfuro proporciona más estabilización a la construcción, lo cual puede resultar ventajoso. Preferiblemente, la pareja de VH/VL está unida por un único enlace disulfuro.

Generalmente, la pareja VH/VL estará unida entre sí por un único enlace disulfuro entre dos cisteínas modificadas, una en VH y la otra en VL.

5 En el contexto de la presente invención, la pareja de dominios variables (VH/VL) está unido mediante un enlace disulfuro entre dos restos cisteína modificados, en la que el resto cisteína modificado de VH está en la posición 44, y resto cisteína modificado de VL está en la posición 100, según la numeración de Kabat.

Las posiciones adecuadas para introducir cisteínas modificadas son conocidas en la técnica, y algunas de las cuales se listan a continuación. Se apreciará que pueden existir otras posiciones.

10 En la presente descripción, el enlace disulfuro estar entre (a menos que el contexto indique lo contrario; en la siguiente lista se emplea la numeración de Kabat (Kabat *et al.*, 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, EE. UU.)):

- 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);

15 - 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;

20 - VH98 + VL46, véase, por ejemplo, *Protein Science*, 6, 781-788, Zhu *et al.* (1997);

- VH101+ VL46; o

- VH105 + VL43, véase, por ejemplo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 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).

25 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 modificarse en estas posiciones por medio de técnicas conocidas.

30 En uno o más aspectos, el enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera, tal como entre el dominio CH y el dominio CL o CK, no está presente, por ejemplo debido a que una o más cisteínas que forman el enlace han sido reemplazadas. Dichas una o más cisteínas pueden ser reemplazadas, por ejemplo, por serina.

En uno o más aspectos, está presente un enlace disulfuro intercatenario entre la cadena pesada y ligera entre el dominio CH y el dominio CL o CK.

35 En un aspecto, se proporciona un fragmento F(ab)₂ que comprende uno, dos, tres o cuatro anticuerpos de dominio único, por ejemplo, dos parejas de VH/VL separadas que pueden dirigirse al mismo antígeno o a antígenos diferentes.

En un ejemplo, las proteínas de fusión de anticuerpo de la invención no comprenden un dominio Fc. En un ejemplo, las proteínas de fusión de anticuerpo de la invención no comprenden un dominio CH2 o CH3.

En las proteínas de fusión de especificidad dual de la presente invención, el anticuerpo o anticuerpos de dominio único se unen a un segundo antígeno, diferente del antígeno al que se une el componente de fragmento Fab o Fab'.

40 En un ejemplo, los dAb para su uso en la presente invención muestran especificidad por una proteína de la vía del complemento, una proteína marcadora de CD o un FcγR. En este caso, el dAb es preferiblemente específico para una molécula de CD. Lo más preferiblemente, el dAb muestra especificidad por una molécula de CD seleccionada del grupo que consiste en CD68, CD80, CD86, CD64, CD3, CD4, CD8 CD45, CD16 y CD35.

45 En un ejemplo preferido, los dAb para su uso en la presente invención muestran especificidad por una proteína portadora sérica, una molécula de inmunoglobulina de la circulación, o CD35/CR1, y la proteína portadora sérica preferiblemente es una proteína portadora sérica humana, tal como la proteína de unión a tiroxina, la transtiretina, la glicoproteína ácida-α1, la transferrina, el fibrinógeno o la albúmina del suero. Lo más preferiblemente, el dAb muestra especificidad por la albúmina del suero humana. Así, en un ejemplo, un conejo, un ratón, una rata, un

camello o una llama se inmuniza con una proteína portadora sérica, una molécula de inmunoglobulina de la circulación, o CD35/CR1 (por ejemplo, albúmina del suero humana) y se recoge sangre cuando la titulación sea la apropiada. El gen que codifica el dAb puede clonarse mediante PCR de una sola célula, o la célula o células B que codifican el dAb pueden immortalizarse por medio de una transformación con EBV, o mediante fusión con una línea de células inmortales. Como alternativa, el anticuerpo de dominio único puede obtenerse mediante presentación en fagos, tal como se describió anteriormente en la presente.

En una realización, el anticuerpo o anticuerpos de dominio único para su uso en la presente invención se unen a la albúmina del suero humana. En una realización, el anticuerpo o anticuerpos de dominio único para su uso en la presente invención se unen a la albúmina del suero humana, a la albúmina del suero murina y a la albúmina del suero de rata.

En una realización, el anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero es un dAb proporcionado en el documento WO2005/118642 (véanse, por ejemplo, las figuras 1c y 1d) o una VHH proporcionada en el documento WO2004/041862, o un nanocuerpo humanizado descrito, por ejemplo, en la tabla III del documento WO2006/122787.

En una realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VH de cadena pesada, que comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (e) SEQ ID NO:56 o la figura 5 (k) SEQ ID NO:62 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (f) SEQ ID NO:57 o la figura 5 (l) SEQ ID NO:63 para CDR-H2, y una CDR que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (g) SEQ ID NO:58 o la figura 5 (m) SEQ ID NO:64 para CDR-H3.

En otra realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de VH de cadena pesada, en el que al menos dos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio VH se seleccionan de lo siguiente: la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:56 o 62 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:57 o SEQ ID NO:63 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:58 o SEQ ID NO:64 para CDR-H3. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio único puede comprender un dominio VH en el que CDR-H1 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:56, y CDR-H2 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:57. Como alternativa, el anticuerpo de dominio único puede comprender un dominio VH en el que CDR-H1 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:56, y CDR-H3 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:58. Con el fin de evitar dudas, se entiende que están incluidas todas las permutaciones.

En otra realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VH cadena pesada, en el que el dominio VH comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO:56 para CDR-H1, la secuencia indicada en SEQ ID NO:57 para CDR-H2 y la secuencia indicada en SEQ ID NO:58 para CDR-H3.

En otra realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VH cadena pesada, en el que el dominio VH comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO:62 para CDR-H1, la secuencia indicada en SEQ ID NO:63 para CDR-H2 y la secuencia indicada en SEQ ID NO:64 para CDR-H3.

En una realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VH cadena pesada humanizado, dAbH1, que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (a) (SEQ ID NO:52). Un ejemplo de una fusión CH1-dAbH1 adecuada que comprende un conector G₄S se indica en la figura 6 (SEQ ID NO:68).

En una realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VH cadena pesada humanizado, dAbH2, que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (c) (SEQ ID NO:54). Un ejemplo de una fusión CH1-dAbH2 adecuada que comprende un conector G₄S se indica en la figura 6 (SEQ ID NO:69).

Los restos en los dominios variables de un anticuerpo se numeran convenientemente según un sistema diseñado por Kabat *et al.* Este sistema se establece en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., NIH, EE.UU. (a partir de ahora, "Kabat *et al.* (anteriormente mencionado)"). En la presente especificación se usa dicho sistema de numeración, a menos que se indique lo contrario.

Las denominaciones de los restos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos aminoácidos. La secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos o más aminoácidos que la numeración de Kabat estricta correspondiente a un acortamiento o a una inserción en un componente estructural, región de marco o región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico. La numeración de Kabat correcta de los restos se puede determinar para un anticuerpo dado por medio de un alineamiento de restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

- 5 Las CDR del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los restos 31-35 (CDR-H1), los restos 50-65 (CDR-H2) y los restos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el resto 26 al resto 32. Por tanto, 'CDR-H1', tal como se usa en la presente, comprende los restos 26 a 35, descritos mediante una combinación del sistema de numeración Kabat y la definición topológica de bucle de Chothia.
- Las CDR del dominio de cadena ligera están localizadas en los restos 24-34 (CDR-L1), los restos 50-56 (CDR-L2) y los restos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración Kabat.
- 10 En una realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VL de cadena ligera, que comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (h) SEQ ID NO:59 o la figura 5 (m) SEQ ID NO:65 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (i) SEQ ID NO:60 o la figura 5 (o) SEQ ID NO:66 para CDR-L2, y una CDR que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (j) SEQ ID NO:61 o la figura 5 (p) SEQ ID NO:67 para CDR-L3.
- 15 En otra realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de VL de cadena ligera, en el que al menos dos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio VL se seleccionan de lo siguiente: la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:59 o SEQ ID NO:65 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:60 o SEQ ID NO:66 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en SEQ ID NO:61 o SEQ ID NO:67 para CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo de dominio puede comprender un dominio VL, en el que la CDR-L1 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:59, y la CDR-L2 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:60. Como alternativa, el anticuerpo de dominio puede comprender un dominio VL, en el que la CDR-L1 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:59, y la CDR-L3 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:61. Con el fin de evitar dudas, se entiende que están incluidas todas las permutaciones.
- 20 En otra realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio VL cadena ligera, en el que el dominio VL comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO:59 para CDR-L1, la secuencia indicada en SEQ ID NO:60 para CDR-L2 y la secuencia indicada en SEQ ID NO:61 para CDR-L3.
- 25 En otra realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio VL cadena ligera, en el que el dominio VL comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO:65 para CDR-L1, la secuencia indicada en SEQ ID NO:66 para CDR-L2 y la secuencia indicada en SEQ ID NO:67 para CDR-L3.
- 30 En una realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VL cadena ligera humanizado, dAbL1, que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (b) (SEQ ID NO:53). Un ejemplo de una fusión CH1-dAbL1 y una fusión Ck1-dAbL1 adecuadas, en las que ambas comprenden un conector G₄S, se indica en la figura 6 (SEQ ID NO:70 y SEQ ID NO:72).
- 35 En una realización, un anticuerpo de dominio único que se une a la albúmina del suero humana para su uso en la presente invención es un anticuerpo de dominio único de VL cadena ligera humanizado, dAbL2, que tiene la secuencia indicada en la figura 5 (d) (SEQ ID NO:55). Un ejemplo de una fusión CH1-dAbL2 y una fusión Ck1-dAbL2 adecuadas, en las que ambas comprenden un conector G₄S, se indica en la figura 6 (SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:73).
- 40 En una realización, cuando las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo C-terminal, y los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al antígeno cooperativamente, tal como se describió anteriormente en la presente, el dAb de VH es dAbH1 (SEQ ID NO:52) y el dAb de VL es dAbL1 (SEQ ID NO:53).
- 45 En una realización, cuando las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo C-terminal, y los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al antígeno cooperativamente, tal como se describió anteriormente en la presente, el dAb de VH es dAbH2 (SEQ ID NO:54) y el dAb de VL es dAbL2 (SEQ ID NO:55).
- 50 En una realización, cuando las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo C-terminal, y los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al antígeno cooperativamente, tal como se describió anteriormente en la presente, el dAb de VH tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:202, y el dAb de VL tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:203.
- 55 En una realización, cuando las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo C-terminal, y los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al antígeno cooperativamente, tal como se describió anteriormente en la presente, el dAb de VH tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:204, y el dAb de VL tiene la secuencia indicada en SEQ ID

NO:205.

5 En una realización, cuando las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo N-terminal, y los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al antígeno cooperativamente, tal como se describió anteriormente en la presente, el dAb de VH tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:202, y el dAb de VL tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:203.

10 En una realización, cuando las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab o Fab' comprenden, cada una, un anticuerpo de dominio único en el extremo N-terminal, y los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al antígeno cooperativamente, tal como se describió anteriormente en la presente, el dAb de VH tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:204, y el dAb de VL tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:205.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos de unión a la albúmina, o sus fragmentos, que contienen una o más de las CDR proporcionadas en la presente anteriormente y en la figura 5 (e-p), y en particular comprenden una CDRH1 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:56, una CDRH2 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:57, una CDRH3 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:58, una CDRL1 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:59, una CDRL2 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:60 y /o una CDRL3 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:61. En una realización, los anticuerpos de unión a la albúmina, o sus fragmentos, comprenden una CDRH1 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:62, una CDRH2 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:63, una CDRH3 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:64, una CDRL1 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:65, una CDRL2 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:66 y /o una CDRL3 con la secuencia indicada en SEQ ID NO:67. Dichas CDR pueden incorporarse en cualquier marco de anticuerpo adecuado y en cualquier formato de anticuerpo adecuado. Estos anticuerpos incluyen anticuerpos completos y sus fragmentos o derivados funcionalmente activos, y pueden ser, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales, humanizados, totalmente humanos o quiméricos. Por consiguiente, dichos anticuerpos de unión a la albúmina pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que presenta las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, o uno de sus fragmentos, y pueden ser, pero no se limitan a Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único, scFv, anticuerpos bi-, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos y los fragmentos de unión a epitopos de cualquiera de los mencionados (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.*, 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews* - en línea 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO92/22853 y WO05/113605). Se apreciará que este aspecto de la invención también se extiende a los variantes de estos anticuerpos de unión a la albúmina.

35 Se apreciará que estos anticuerpos de unión a la albúmina, en particular los anticuerpos de dominio único, pueden conjugarse con cualquier otro anticuerpo o proteína u otra molécula, según se desee, o utilizarse en cualquier otro contexto adecuado. En un ejemplo, los anticuerpos de dominio único dAbH1, dAbL1, dAbH2, dAbL2, según se describieron anteriormente y tal como se muestran en la figura 5 (a-d) y la figura 24, pueden incorporarse en cualquier formato de anticuerpo adecuado o pueden usarse como anticuerpos de dominio único en cualquier contexto adecuado, tal como una fusión o un conjugado.

40 En un ejemplo, los anticuerpos de este aspecto de la descripción comprenden la secuencia indicada en la figura 5(e) para CDR-H1, la secuencia indicada en la figura 5(f) para CDR-H2 y la secuencia indicada en la figura 5(g) para CDR-H3.

45 En un ejemplo, los anticuerpos de este aspecto de la descripción comprenden la secuencia indicada en la figura 5(k) para CDR-H1, la secuencia indicada en la figura 5(l) para CDR-H2 y la secuencia indicada en la figura 5(m) para CDR-H3.

En un ejemplo, los anticuerpos de este aspecto de la descripción comprenden la secuencia indicada en la figura 5(h) para CDR-L1, la secuencia indicada en la figura 5(i) para CDR-L2 y la secuencia indicada en la figura 5(j) para CDR-L3.

50 En un ejemplo, los anticuerpos de este aspecto de la descripción comprenden la secuencia indicada en la figura 5(n) para CDR-L1, la secuencia indicada en la figura 5(o) para CDR-L2 y la secuencia indicada en la figura 5(p) para CDR-L3.

55 La descripción también proporciona un Fv o scFv que comprende un dominio VH y/o un dominio VL que tiene una secuencia indicada en la figura 5(a) a (d) o la figura 24. En un aspecto, el Fv o scFv comprende un VH que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:202, y un VH que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:203. En un aspecto, el Fv o scFv comprende un VH que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:204, y un VL que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:205.

El VH y VL del scFv, por ejemplo, están en la orientación VHVL (N a C-terminal). En un aspecto, el VH y VL están en la orientación VLVH (N a C-terminal).

ES 2 736 649 T3

Tal como se describió anteriormente, los fragmentos scFv o Fv también pueden incorporarse en cualquier formato de anticuerpo adecuado. Por ejemplo, pueden fusionarse o conjugarse con uno o más fragmentos de anticuerpos.

- 5 En los siguientes formatos de anticuerpos, cada una de las secuencias del listado de secuencias en la presente puede localizarse en la posición correspondiente a la posición natural o a una posición no natural. La posición natural será, para la posición pertinente en el listado indicada como CDRH1, la posición H1, para la posición pertinente en el listado indicada como CDRH2, la posición H2, para la posición pertinente en el listado indicada como CDRH3, la posición H3, para la posición pertinente en el listado indicada como CDRL1, la posición L1, para la posición pertinente en el listado indicada como CDRL2, la posición L2, y para la posición pertinente en el listado indicada como CDRL3, la posición L3. También se contemplan sus combinaciones, tales como H1 y H2, H1 y H3, H1 y L1, H1 y L2, H1 y L3, H2 y L1, H2 y L2, H2 y L3, H2 y H3, H3 y L1, H3 y L2, H3 y L3, H1 y H2 y H3, H1 y H2 y L1, H1 y H2 y L2, H1 y H2 y L3, H2 y H3 y L1, H2 y H3 y L2, H2 y H3 y L3, H3 y L1 y L2, H3 y L1 y L3, H3 y L2 y L3, L1 y L2 y L3, H1 y H2 y H3 y L1, H1 y H2 y H3 y L2, H1 y H2 y H3 y L3, H2 y H3 y L1 y L2, H2 y H3 y L1 y L3, y H2 y H3 y L2 y L3, H3 y L1 y L2 y L3, H1 y H2 y H3 y L1 y L2, H1 y H2 y H3 y L2 y L3, H1 y H2 y H3 y L1 y L3, L1 y L2 y L3 y H1 y H2, L1 y L2 y L3 y H1 y H3, L1 y L2 y L3 y H2 y H3, H1 y H2 y H3 y L1 y L2 y L3.
- 10
- 15 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:222, 223, 90 a 93.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:94 a 99.
- 20 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:100 a 105.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:106 a 111.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:112 a 117.
- 25 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:118 a 123.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:124 a 129.
- 30 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:130 a 135.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:136 a 141.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:142 a 147.
- 35 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:148 a 153.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:154 a 159.
- 40 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:160 a 165.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:166 a 171.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:172 a 177.
- 45 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:178 a 183.
- En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:184 a 189.
- 50 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:190 a 195.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende una secuencia, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias seleccionadas de SEQ ID NO:196 a 201.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:202.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:203.

5 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:202 y 203.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:204.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:205.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:204 y 205.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:206.

10 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:207.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende SEQ ID NO:206 y 207.

En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO:202, en la que el A en la posición 84 ha sido sustituido por D.

15 En un aspecto, la proteína de fusión de anticuerpo de la descripción comprende la secuencia indicada en SEQ ID NO:204, en la que el A en la posición 84 ha sido sustituido por D.

20 Cuando el anticuerpo o anticuerpos de dominio único de la proteína de fusión de especificidad dual de la presente descripción se unen a la albúmina, la afinidad de unión del anticuerpo de dominio único por la albúmina será suficiente para extender la semivida del Fab o Fab' *in vivo*. Se ha indicado que una afinidad por la albúmina menor o igual a 2,5 μM extenderá la semivida *in vivo* (Nguyen, A. *et al.* (2006), Protein Engineering, Design & Selection, 19(7), 291-297). Las moléculas de anticuerpos de dominio único de la presente invención preferiblemente tendrán una afinidad de unión adecuada a su propósito y al antígeno al cual se unen. En un ejemplo, los anticuerpos de dominio único presentan una alta afinidad de unión, por ejemplo, picomolar. En un ejemplo, los anticuerpos de dominio único presentan una afinidad de unión por el antígeno que es nanomolar o micromolar. La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo BIAcore como se describe en los ejemplos de la presente, empleando un antígeno natural o recombinante.

25 Preferiblemente, las moléculas de anticuerpos de dominio único de la presente invención que se unen a la albúmina presentan una afinidad de unión de aproximadamente 2 μM o mejor. En un aspecto, la molécula de anticuerpo de dominio único la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 1 μM o mejor. En un aspecto, la molécula de anticuerpo de dominio único la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 500 nM o mejor. En un aspecto, la molécula de anticuerpo de dominio único la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 200 nM o mejor. En un aspecto, la molécula de anticuerpo de dominio único la presente invención presenta una afinidad de unión de aproximadamente 1 nM o mejor. Se apreciará que la afinidad de anticuerpos de dominio único para su uso en la descripción y conocidos en la técnica puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de dominio de la presente invención, que presentan una afinidad mejorada por la albúmina. Dichos variantes se pueden obtener a través de una serie de protocolos de maduración por afinidad que incluyen la mutación de 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 de ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), la presentación en fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y la PCR sexual (Crameri *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (*supra*) analiza estos métodos de maduración por afinidad.

30 El anticuerpo o anticuerpos de dominio único de la proteína de fusión de especificidad dual pueden proporcionarse como monómeros, dímeros o trímeros, según sea necesario. El producto deseado puede obtenerse ajustando las etapas de procesamiento corriente abajo a las cuales se somete el material. En un aspecto, el material procesado se proporciona como un monómero sustancialmente homogéneo. En un aspecto, el material procesado se proporciona como un dímero sustancialmente homogéneo. En un aspecto, el material procesado se proporciona como un trímero sustancialmente homogéneo.

35 La presente descripción también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención. Las secuencias de ADN de la presente invención pueden comprender ADN sintético, por ejemplo producido por un proceso químico, ADNc, ADN genómico o cualquiera de sus combinaciones.

40 Las secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención pueden obtenerse mediante métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las

secuencias de ADN que codifican una parte o todos los fragmentos de anticuerpo, conectores y/o dAb pueden sintetizarse según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas, o basándose en las correspondientes secuencias de aminoácidos.

5 Se pueden usar técnicas convencionales de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completa o parcialmente mediante el uso de técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden usar técnicas de mutagénesis dirigida específica de sitio y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su nombre en inglés), según sea apropiado.

10 La presente descripción se refiere además a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención. En un aspecto preferido, el vector de clonación o de expresión comprende una única secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual completa. Por tanto, el vector de clonación o de expresión comprende unidades de transcripción codificadas en el ADN en secuencia, de modo que se produce la proteína de fusión de traducción.

15 En efecto, los expertos en la técnica entenderán que una proteína de fusión de la invención puede presentar el dAb en el extremo N-terminal o C-terminal y, por tanto, la unidad de transcripción codificada en el ADN del dAb estará en primer lugar o en último lugar, respectivamente, dentro de la secuencia de ADN que codifica la fusión de traducción. Así, una fusión de traducción puede comprender un dAb N-terminal y un Fab o Fab' C-terminal. Además, una fusión de traducción puede comprender un Fab o Fab' N-terminal y un dAb C-terminal.

Se apreciará que la cadena pesada y la cadena ligera del Fab o Fab' pueden incorporarse al mismo vector o a vectores diferentes. En un aspecto, un vector puede comprender una fusión de traducción que comprende una cadena pesada de Fab o Fab' y un dAb C-terminal, y otro vector puede comprender una fusión de traducción que comprende una cadena ligera de Fab o Fab' y un dAb C-terminal.

25 Por ejemplo, cuando se desee producir una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual con el resto dAb en el extremo N-terminal del fragmento de anticuerpo, el vector comprenderá las unidades de transcripción de ADN en el orden de secuencia: una unidad de transcripción de ADN que codifica el resto dAb, opcionalmente una unidad de transcripción de ADN que codifica una secuencia de conector, y una unidad de transcripción de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo. Cuando se desee producir una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual con el resto dAb en el extremo C-terminal del fragmento de anticuerpo, el vector comprenderá las unidades de transcripción de ADN en el orden de secuencia: una unidad de transcripción de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo, opcionalmente una unidad de transcripción de ADN que codifica una secuencia de conector, y una unidad de transcripción de ADN que codifica un resto dAb con especificidad para una proteína portadora sérica, una molécula de inmunoglobulina de la circulación, o CD35/CR1, por ejemplo, la albúmina del suero humana. Así, una fusión de traducción de la invención puede estar en diferentes configuraciones que incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, dAb-conector-Fab, Fab-conector-dAb, dAb-Fab, Fab-dAb, Fab'-dAb, dAb-Fab', dAb-conector-Fab', Fab'-conector-dAb. Por ejemplo, cuando se emplean dos vectores, el primero puede comprender la cadena pesada de un Fab o Fab' condensada con un dAb, y el segundo puede comprender la cadena ligera de un Fab o Fab' condensado con un dAb.

40 El ADN que codifica un fragmento de anticuerpo comprendido dentro de una fusión de traducción puede incorporarse en un vector como una unidad de transcripción en configuraciones conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, una unidad de transcripción puede comprender la codificación de la cadena ligera, seguido de la codificación de la cadena pesada o viceversa; véase, en concreto, Humphreys *et al.*, 2002, Protein Expression and Purification, 26:309-320.

45 Preferiblemente, un vector comprende una secuencia conductora apropiada, tal como una secuencia conductora de anticuerpo. Estas secuencias conductoras son muy conocidas en la técnica.

50 Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y transformación y los métodos de cultivo son muy conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a Current Protocols in Molecular Biology, 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y al manual de Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

55 También se proporciona una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención. Se puede utilizar cualquier sistema adecuado de célula hospedante/vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual. Se pueden utilizar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o también se pueden utilizar sistemas de expresión de células hospedantes eucariotas, por ejemplo de mamífero. Las células hospedantes de mamífero idóneas incluyen NSO, CHO, mieloma o hibridoma. Por consiguiente, en un ejemplo, la proteína de fusión de la presente invención se expresa en *E. coli*. En otro ejemplo, la proteína de fusión de la presente invención se

expresa en células de mamífero.

5 La presente descripción también proporciona un proceso para la producción de una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual, que comprende cultivar una célula hospedante que comprende un vector de la presente descripción bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína a partir de la secuencia de ADN que codifica dicha proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual. La descripción proporciona además métodos para aislar la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual.

10 Tras su producción, una proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la presente invención puede purificarse, cuando sea necesario, empleando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, pero sin limitación, pueden emplearse técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de intercambio iónico, de exclusión molecular, de proteína G o de interacción hidrófoba.

15 El tamaño de la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual se puede confirmar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, tales como la cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE no reductor. Estas técnicas pueden emplearse, por ejemplo, para confirmar que la proteína no ha dimerizado y/o no le falta una porción, por ejemplo, la porción de dAb. Si se detectan dímeros y es necesario un producto monomérico homogéneo, entonces la proteína de fusión de anticuerpo de especificidad dual monomérica puede purificarse de las especies diméricas empleando técnicas de cromatografía convencionales, según se describió anteriormente.

Las proteínas de fusión de anticuerpo de especificidad dual de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos, que incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos inmunológicos, trastornos fibróticos y cánceres.

20 Las expresiones "enfermedad o trastorno inflamatorio" y "enfermedad o trastorno inmunológico" incluyen artritis reumatoide, artritis psoriática, enfermedad de Still, enfermedad de Muckle Wells, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, SLE (lupus eritematoso sistémico), asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mellitus de tipo I, trasplantes y enfermedad injerto frente al receptor.

25 La expresión "trastorno fibrótico" incluye fibrosis pulmonar idiopática (IPF), esclerosis sistémica (o escleroderma), fibrosis renal, nefropatía diabética, nefropatía por IgA, hipertensión, enfermedad renal en fase terminal, fibrosis peritoneal (diálisis peritoneal ambulatoria continua), cirrosis hepática, degeneración macula asociada con la edad (ARMD), retinopatía, fibrosis reactiva cardíaca, cicatrización, queloides, quemaduras, úlceras de la piel, angioplastia, cirugía de bypass coronario, artroplastia y cirugía de cataratas.

30 El término "cáncer" incluye un nuevo crecimiento maligno que surge del epitelio, se encuentra en la piel, o de modo más habitual, en el revestimiento de los órganos corporales, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y a propagarse (metastatizar) hacia órganos distantes, por ejemplo: a hueso, hígado, pulmón o el cerebro.

35 Así, según otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una fusión de anticuerpo de la invención en asociación con uno o más vehículo, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. También se describe el uso de una proteína de fusión de anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno. Lo más preferiblemente, la enfermedad o el trastorno es una enfermedad o un trastorno inflamatorio.

Las composiciones farmacéuticas pueden tener una forma adecuada para la administración oral, bucal, parenteral, nasal, tópica, oftálmica o rectal, o una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación.

40 Cuando resulte apropiado, por ejemplo, si el anticuerpo o anticuerpos de dominio único de la proteína de fusión de anticuerpo se unen a la albúmina, puede resultar deseable preformular la proteína de fusión de especificidad dual con albúmina del suero humana o recombinante, empleando cualquier método adecuado conocido en la técnica.

45 Cuando la formulación farmacéutica es un líquido, por ejemplo, una disolución o una suspensión, entonces la formulación puede comprender además albúmina, por ejemplo, albúmina del suero humana, en particular albúmina recombinante, tal como albúmina del suero humana recombinante. Las cantidades adecuadas pueden encontrarse en la gama de menos del 2% en p/p de la formulación total, en particular menos del 1, 0,5, o 0,1% en p/p. Esto puede ayudar a la estabilización del componente de anticuerpo en la formulación. La composición farmacéutica puede liofilizarse para su posterior reconstitución con un disolvente acuoso.

50 En un aspecto, se proporciona un recipiente de dosis unitaria, tal como un vial, que comprende un "anticuerpo" liofilizado según la invención.

55 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes ligantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o bifosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de

- sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por medio de métodos muy conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión, agentes emulgentes, vehículos no acuosos o conservantes. Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes edulcorantes, según sea apropiado.
- Las preparaciones para la administración oral se pueden formular de modo adecuado para obtener una liberación controlada del compuesto activo.
- Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.
- Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante una inyección en embolada o infusión. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas de vidrio o recipientes de dosis múltiples, por ejemplo viales de vidrio. Las composiciones para inyección pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre apirógena, antes del uso.
- Además de las formulaciones descritas anteriormente, los anticuerpos biespecíficos de la invención también se pueden formular como una preparación de liberación lenta (depot). Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación o por inyección intramuscular.
- Para la administración nasal o la administración mediante inhalación, los compuestos según la presente invención pueden administrarse de forma conveniente en forma de una presentación en pulverizado de aerosol para envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, fluorotriclorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas o mezcla de gases adecuados.
- Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase o dispositivo dispensador puede acompañarse de instrucciones para su administración.
- Para la administración tópica, los compuestos según la presente invención pueden formularse, de modo conveniente, en un ungüento adecuado que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos concretos incluyen, por ejemplo, aceite mineral, petróleo líquido, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulgente y agua. Como alternativa, los compuestos según la presente invención pueden formularse en una loción adecuada que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos concretos incluyen, por ejemplo, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, alcohol bencílico, 2-octildodecanol y agua.
- En un ejemplo, se proporciona la formulación en forma de una formulación para administraciones tópicas, que incluyen la inhalación.
- Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosimétricos que contienen gases propelentes o disoluciones inhalables sin gases propelentes. Los polvos inhalables según la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir solamente en las sustancias activas anteriormente mencionadas o en una mezcla de las sustancias activas anteriormente mencionadas con un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 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 mezclas de estos entre sí. Se utilizan de modo adecuado mono- o disacáridos, y la lactosa o la glucosa, en particular, pero no exclusivamente, se utilizan en forma de sus hidratos.
- Las partículas para el depósito en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 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 gran importancia.
- Los gases propelentes que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propelentes adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano e hidrocarburos halogenados, tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes anteriormente mencionados se pueden utilizar como tales o en mezclas de los mismos.

Los gases propelentes particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a 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.

5 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente 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.

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

10 Como alternativa, las administraciones tópicas en el pulmón también pueden ser mediante la administración de una disolución líquida o una formulación en suspensión, 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.).

15 Los formatos de anticuerpo de la invención se pueden suministrar en un disolvente, por ejemplo, en forma de una disolución o una suspensión. Pueden suspenderse en una disolución fisiológica apropiada, por ejemplo, disolución salina u otro disolvente o disolución tamponada farmacológicamente aceptable. 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 de manera que se logre un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Una suspensión puede contener, por ejemplo, el anticuerpo liofilizado.

20 Las formulaciones en suspensión o en disolución 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 suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procedimientos de fabricación estériles.

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

30 La formulación nebulizable según la presente descripción puede ser proporcionada, por ejemplo, en forma de unidades de dosis unitaria (por ejemplo, recipientes de plástico o viales sellados) envasados en sobres de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, de 2 ml de disolvente/disolución tampón.

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

40 Para la administración oftálmica, los compuestos según la presente invención pueden formularse de forma conveniente como suspensiones micronizadas en disolución salina isotónica estéril con pH ajustado, con o sin un conservante, tal como un agente bactericida o fungicida, por ejemplo, nitrato fenilmercurio, cloruro de benzalconio o acetato de clorhexidina. Como alternativa, para la administración oftálmica, los compuestos pueden formularse en una ungüento, tal como vaselina.

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

50 La cantidad de un compuesto de la invención requerido para la profilaxis o el tratamiento de un trastorno concreto variará dependiendo del compuesto elegido y de la afección del paciente que se está tratando. Sin embargo, en general las dosificaciones diarias pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg a 1000 mg/kg, generalmente de 100 ng/kg a 100 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 0,01 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal para la administración oral o bucal, de aproximadamente 10 ng/kg a 50 mg/kg de peso corporal para la administración parenteral, y de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 1000 mg, por ejemplo de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1000 mg para la administración nasal o para la administración mediante inhalación o insuflación.

Se pretende que "lo que comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva signifique "que incluye".

Cuando sea técnicamente apropiado, se pueden combinar las realizaciones de la invención.

Las realizaciones descritas en la presente comprenden ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a realizaciones diferentes que consistan o que consistan fundamentalmente en dichas características/elementos.

- 5 La invención se describirá a continuación remitiéndose a los siguientes ejemplos, que son solo ilustrativos y no deben considerarse, de ninguna manera, limitantes del alcance de la presente invención, que en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones.

Lista de figuras:

Figura 1: Representación esquemática de Fab-dAb, en los que el dAb está en el extremo C-terminal

Figura 2A: Representación esquemática de Fab-didAb

- 10 Figura 2B: Representación esquemática de Fab-didAb con una estabilización por disulfuro adicional entre los dAb

Figura 3: Análisis de SDS-PAGE de FabA-dAbL3 (CK-SG₄SE) (1) y FabA-dAbL3 (CK-G[APAPA]₂) (2)

Figura 4: Análisis de la transferencia Western de FabA-dAbL3 (CK-SG₄SE) (1) y FabA-dAbL3 (CK-G[APAPA]₂) (2)

Figura 4a: SDS-PAGE de FabB-didAb

Carril M = marcadores SeeBlue

- 15 Carriles 1 y 2 = control de IgG

Carril 3 = FabB

Carril 4 = FabB-didAb, -dAbL1 (CK-G4Sx2) y dAbH1 (CH1-G4Sx2)

Carril 5 = FabB-didAb, -dAbL2 (CK-G4Sx2) y dAbH2 (CH1-G4Sx2)

- 20 Figura 5: Secuencias de los anticuerpos de dominio dAbH1, dAbH2, dAbL1 y dAbL2, y las CDR derivadas de cada uno de estos anticuerpos

Figura 6: Construcciones de FabB-dAb que comprenden el dominio variable de cadena pesada o ligera de FabB condensado con un anticuerpo de dominio

Figura 7: Secuencias de la cadena pesada y ligera de Fab'A y secuencia de la cadena pesada de FabA

Figuras 8a, 8b y 8c: Secuencias de aminoácidos de Fab-didAb murinizado

- 25 La figura 8a muestra la secuencia de aminoácidos de las CDR en diversos dAb murinos.

La figura 8b muestra la secuencia de aminoácidos de mFabD-mdidAb:

dAbL1(CK-G4Sx2)

dAbH1(CH1-G4Sx2)

dAbL2(CK-G4Sx2) y

- 30 dAbH2(CH1-G4Sx2)

La figura 8c muestra la secuencia de aminoácidos de mFabD-mdidAb:

dAbL1(CK-G4Sx2) y

dAbH1(CH1-G4Sx2)mFabC-mdAbH1

dAbL2(CK-G4Sx2) y

- 35 dAbH2(CH1-G4Sx2)

La figura 9 muestra una SDS-PAGE de FabB-didAb.

Los carriles 1 y 4 son Fab'B.

Los carriles 2 y 5 son FabB-didAb, -dAbL1(CK-G4Sx2) y -dAbH1(CH1-G4Sx2).

Los carriles 3 y 6 son FabB-didAb, -dAbL2(CK-G4Sx2) y -dAbH2(CH1-G4Sx2).

La figura 10 muestra una representación esquemática de un ensayo de estabilidad térmica Thermofluor.

La figura 11 muestra un diagrama de la señal de HAS-FITC/mezclas de HAS-FITC unidas a células T de ratón activadas.

La figura 12 muestra un diagrama de un ensayo de estabilidad de agregación.

- 5 La figura 13 muestra los perfiles de concentración *in vivo* a lo largo del tiempo después de una dosificación subcutánea e intravenosa.

Las figuras 14A, B y C muestran ciertas lecturas de células CD4+ y células CD8+.

La figura 15 muestra un análisis de SDS-PAGE para FabB-645Fv.

La figura 16 muestra un análisis de exclusión molecular de FabB-645Fv.

- 10 La figura 17 muestra termogramas de FabB-645Fv con diversas longitudes del conector.

La figura 18 muestra un análisis de SDS-PAGE de ciertas construcciones de FabB.

La figura 19 muestra un análisis de exclusión molecular de diversas construcciones de FabB-645Fv.

Las figuras 20 a 24 muestran secuencias para ciertos formatos.

- 15 La figura 25 muestra un análisis de SDS-PAGE para una construcción Fab-645dsFv, en la que la pareja VH/VL está localizada en el C-terminal del Fab y está estabilizada con disulfuro.

La figura 26 muestra un análisis de exclusión molecular para una construcción de la figura 25.

La figura 27A muestra un análisis de termofluor para una construcción según la presente descripción.

La figura 27B muestra una gráfica de Tm frente al pH.

- 20 La figura 28 muestra un ensayo *in vitro* para una construcción según la presente invención, basado en la inhibición de la unión del ligando OX40 humano a PCMB humanas.

Las figuras 29A-D muestran la eficacia *in vivo* de un construcción según la presente descripción y, en particular, el efecto sobre CD4+ y CD8+, sangre y células peritoneales y del bazo.

Las figuras 30A-D muestran secuencias para ciertos formatos según la descripción.

La figura 31 muestra los datos de expresión para ciertas construcciones.

- 25 Las figuras 32A-C muestran los datos de unión para ciertas construcciones.

Leyenda

-645Fv	es igual a didAbL1 y H1 (el conector usado para cada dAB será el mismo, a menos que se indique lo contrario).
648Fv	es igual a didAbL2 y H2 (el conector usado para cada dAB será el mismo, a menos que se indique lo contrario).
-645dsFv	es igual a didAbL1 y H1 (el conector usado para cada dAB será el mismo, a menos que se indique lo contrario), en los que L1 y H1 están estabilizados mediante un enlace disulfuro.
-648dsFv	es igual a didAbL2 y H2 (el conector usado para cada dAB será el mismo, a menos que se indique lo contrario), en los que L2 y H3 están estabilizados mediante un enlace disulfuro.
FabΔ	son Fab que carecen del enlace cisterína intercatenario (es decir, entre CH y CL o CK).

Parte experimental:

Abreviaturas: A menos que el contexto indique lo contrario, "m", como prefijo, indica murino.

- 30 A menos que el contexto indique lo contrario, "h", como prefijo, indica humano. Los componentes de Fab A, Fab B, Fab C y Fab D pueden proporcionarse en diferentes formatos.

Ejemplo 1: Producción de un dAb específico para la albúmina del suero humana

Se produjo una unidad de transcripción codificada en el ADN dentro de marco que codifica un dAb con especificidad por la albúmina del suero humana, empleando la tecnología del ADN recombinante.

5 Cuando se desee, puede producirse una unidad de transcripción codificada en el ADN dentro de marco que codifique un dAb con especificidad por una proteína de reclutamiento, empleando la tecnología del ADN recombinante.

Ejemplo 2: Producción de un fragmento de anticuerpo

10 Para la fusión de un dAb con el extremo C-terminal de la cadena ligera, se sintetizó un ADN que codifica una región constante de cadena ligera kappa humana (con el alotipo Km3 de la región constante kappa), un conector peptídico y un dAb, y se clona como un fragmento de restricción SacI-PvuII en el vector de expresión del laboratorio de los inventores UCB-Celltech pTTOD(Fab) (un derivado de pTTO-1, descrito en Popplewell *et al.*, Methods Mol. Biol., 2005, 308:17-30), que contiene el ADN que codifica la región constante gamma-1 CH1 humana. Esto produjo una disposición de gen dicistrónico que consiste en el gen para la cadena ligera humanizada condensada, a través de un conector, con un dAb, seguido del gen para el fragmento Fab de cadena pesada humanizada, ambos bajo el control del promotor tac. También está codificado un sitio BspE1 exclusivo cadena arriba del conector Gly4Ser, o un sitio Ascl cadena arriba del conector rico en Ala-Pro.

20 Para la fusión de un dAb al extremo C-terminal de la cadena pesada, se sintetizó un ADN que codifica un fragmento CH1 humano (del isotipo γ 1), seguido de una secuencia codificadora de conector y un dAb. Esto se subclonó como un fragmento de restricción Apal-EcoRI en el vector de expresión del laboratorio de los inventores UCB-Celltech pTTOD(Fab) (un derivado de pTTO-1, descrito en Popplewell *et al.*, arriba), que contiene el ADN que codifica la región constante gamma-1 CH1 humana. Esto produjo una disposición de gen dicistrónico que consiste en el gen para la cadena ligera humanizada, una secuencia intergénica no codificadora, seguido de una cadena pesada condensada a través de un conector a un dAb, ambos bajo el control del promotor tac. El plásmido de expresión recombinante se transformó en la cepa de *E. coli* W3110, en donde la expresión es inducida por la adición de IPTG. Se realizaron experimentos de expresión, en un principio a pequeña escala (volúmenes de cultivo de 5 ml) con la adición de IPTG 200 μ M a una OD(600 nm) de aproximadamente 0,5, las células se recolectaron 2 horas después de la inducción y se extrajeron durante la noche a 30 °C en Tris/EDTA. Los extractos aclarados se emplearon para un análisis de afinidad mediante Biacore. Se seleccionaron las construcciones que mostraron unos rendimientos de expresión prometedoros para la fermentación.

30 Métodos aplicables a los siguientes ejemplos y datos comparativos

En los siguientes ejemplos, la cadena de anticuerpo a la cual está condensada el dAb se denomina CK o LC para la cadena ligera cKappa, y CH1 o HC para el dominio constante de cadena pesada, CH1.

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

35 Se construyeron proteínas de fusión de Fab-dAb condensando dAbL3 o dAbH4 al extremo C-terminal de la región constante de la cadena ligera o pesada de FabA. Se empleó un conector flexible (SGGGGSE (SEQ ID NO:1)) o rígido (G(APAPA)₂ (SEQ ID NO:34)) para unir el dAb a la región cKappa (SEQ ID NO:75), mientras que se empleó el conector DKTHTS (SEQ ID NO:2) para unir el dAb a la región CH1 (SEQ ID NO:76). La secuencia de ADN que codifica la fusión de región constante-dAb se fabricó de modo sintético en forma de fragmentos, para permitir la subclonación en la secuencia FabA del vector del laboratorio de los inventores pTTOD.

40 Se construyeron fusiones de cadena ligera-dAb mediante la subclonación del fragmento SacI-Apal de los genes sintetizados, que codifica una cKappa C-terminal condensada a dAbL3 o dAbH4 a través de un conector (SGGGGSE (SEQ ID NO:1)) o un conector rígido (G(APAPA)₂ (SEQ ID NO:34)), en los correspondientes sitios de un plásmido capaz de expresar FabA. Se construyeron fusiones de cadena pesada-dAb mediante la subclonación del fragmento Apal-EcoRI de los genes sintetizados, que codifica un CH1 C-terminal condensado con dAbL3 o dAbH4 a través de un conector DKTHTS, en los correspondientes sitios de un plásmido capaz de expresar FabA.

45 Fab' A se deriva de un anticuerpo de unión a IL-1 beta, cuyas secuencias de cadena pesada y ligera se proporcionan en SEQ ID NO:74 y 75, respectivamente, tal como se muestra en la figura 7. En Fab'A, cuando la cadena ligera presenta un dAb unido, la bisagra de la cadena pesada se altera a DKTHTS aunque no exista ningún dAb unido a la cadena pesada (SEQ ID NO:76).

50 FabA comprende la misma secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO:75) y una secuencia de cadena pesada truncada que termina en la cisteína intercatenaria (SEQ ID NO:77). dAbL3 y dAbH4 son anticuerpos de dominio de cadena ligera y pesada, respectivamente, que se unen a la albúmina del suero humana.

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

Se construyó FabA-didAb con dAbL3 o dAbH4 en ambas cadenas ligera y pesada mediante la subclonación del

fragmento *Apal-EcoRI*, que codifica las fusiones de CH1-dAb, en los plásmidos de Fab-dAb existentes, en los que el dAb está condensado con la cadena ligera a través de un conector flexible.

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

5 Los FabB-dAb FabB-dAbH1 (CH1-G₄Sx2), FabB-dAbH2 (CH1-G₄Sx2), FabB-dAbL1 (CH1-G₄Sx2), FabB-dAbL2 (CH1-G₄Sx2) fueron todos ensamblados mediante PCR y después clonados en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y una secuencia de poliA de SV40E. Se aparearon con un vector similar que contenía la cadena ligera de FabB para la expresión en células de mamífero (véase a continuación).

FabB se deriva de un anticuerpo que se une a una molécula coestimuladora de la superficie celular. Se obtuvieron dAbH1, dAbH2, dAbL1 y dAbL2 como se describe en el ejemplo 3.

10 Expresión en mamíferos de FabB-dAb y didAb

Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de cadena pesada y ligera utilizando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 2 µg del plásmido de cadena pesada + 2 µg del plásmido de cadena ligera con 10 µl de 293fectin + 340 µl de medio Optimem durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla después se añadió a 5 x 10⁶ células HEK293 en suspensión y se incubó durante 4 días con agitación a 37 °C.

Biacore

Se determinaron las afinidades de unión y los parámetros cinéticos para las interacciones de las construcciones de Fab-dAb mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) realizado en un Biacore T100 empleando 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-dAb 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 de los inventores. La inmovilización covalente del anticuerpo de captura se logró mediante la química de acoplamiento de amina convencional.

25 Cada ciclo de ensayo consistió en capturar, en primer lugar, el Fab-dAb empleando una inyección durante 1 min, antes de una fase de asociación que consiste en una inyección del antígeno durante 3 min, tras lo cual se controló la disociación durante 5 min. Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con 2 x inyecciones durante 1 min de HCl 40 mM, seguido de 30 s de NaOH 5 mM. Los caudales utilizados fueron de 10 µl/min para la captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación, y 10 µl/min para la regeneración.

30 Para los ensayos cinéticos, se realizó una titulación del antígeno (para la albúmina del suero humana, generalmente 62,5 nM-2 µM, para IL-1β, 1,25-40 nM), se empleó una célula de flujo de blanco para restar la referencia, y se incluyeron inyecciones de tampón-blanco para restar la deriva y el ruido del instrumento.

35 Se determinaron los parámetros cinéticos mediante un ajuste global simultáneo de los sensogramas resultantes a un modelo de unión 1:1 convencional utilizando el software de Biacore T100 Evaluation. Para ensayar la unión simultánea, se realizaron inyecciones de 3 min de HSA 5 µM o IL-1β 100 nm por separado, o una disolución mixta de HSA 5 µM y IL-1β 100 nm, sobre el Fab-dAb capturado.

Purificación de Fab-dAb de *E. coli*

Extracción periplásmica

40 Se resuspendieron sedimentos de *E. coli* que contenían los Fab-dAb dentro del periplasma, en el volumen de cultivo original con Tris/HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4. Estas suspensiones entonces se incubaron a 4 °C durante 16 horas a 250 rpm. Los sedimentos resuspendidos se centrifugaron a 10000 x g durante 1 hora a 4 °C. Los sobrenadantes se retiraron y se filtraron a 0,45 µm.

Captura de la proteína-G

45 Los Fab-dAb se capturaron a partir del sobrenadante filtrado mediante una cromatografía de proteína G. Brevemente, los sobrenadantes se aplicaron, con un tiempo de residencia de 20 minutos, a una columna Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1, y el material unido se eluyó con glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8. El pico de elución se recogió y el pH se ajustó a aproximadamente pH 5 con acetato de sodio 1 M. Las eluciones con el pH ajustado se concentraron y se diáfiltraron en acetato de sodio 50 mM, pH 4,5, empleando una membrana con un corte de peso molecular de 10 k.

50 *Intercambio iónico*

Los Fab-dAb se purificaron aún más mediante una cromatografía de intercambio catiónico a pH 4,5 con un gradiente de elución de NaCl. Brevemente, los eluatos de proteína-G diáfiltrados se aplicaron a una columna Source15S (GE

Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 50 mM, pH 4,5. La columna se lavó con acetato de sodio 50 mM, pH 4,5, y el material unido se eluyó con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna desde NaCl 0 a 1 M en acetato de sodio 50 mM, pH 4,5. Las fracciones del tercer volumen de columna se recogieron a lo largo del gradiente. Las fracciones se analizaron mediante A280 y SDS-PAGE y se reunieron las fracciones pertinentes.

5 Filtración en gel

Si es necesario, los Fab-dAb se purifican aún más mediante filtración en gel. Brevemente, las fracciones de la elución del intercambio iónico reunidas FabA-dAbL3 (CK-SG₄SE) se aplicaron a una columna Superdex200 (GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,0, y se eluyeron con un gradiente isocrático de acetato de sodio 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,0. Se recogieron las fracciones de 1/120 del volumen de columna a lo largo del gradiente. Las fracciones se analizaron mediante A280 y SDS-PAGE y se reunieron las fracciones pertinentes. Para los Fab-dAb que no se sometieron a la filtración en gel, las fracciones de elución del intercambio iónico reunidas se concentraron y se diafiltraron en acetato de sodio 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,0, empleando una membrana de corte de peso molecular 10 k.

SDS-PAGE

Las muestras se diluyeron con agua cuando fue necesario y después se añadieron, a 10 µl, 10 µl de 2X tampón de ensayo de muestras. Para las muestras no reducidas, se añadieron 2 µl de NEM 100 mM en este momento, y para las muestras reducidas se añadieron 2 µl de 10X de agente reductor. Las muestras se agitaron en vórtice, se incubaron a 85 °C durante 5 mins, se enfriaron y se centrifugaron a 12500 rpm durante 30 seg. Las muestras preparadas se cargaron en un gel de SDS tris/glicina acrilamina al 4-20% y se ensayaron durante 100 min a 125 V. Los geles se trasladaron a membranas de PVDF para un análisis de la transferencia Western o se tñieron con tinte de proteínas azul de Coomassie.

Análisis de la transferencia Western

Los geles se trasladaron a membranas de PVDF en Tris 12 mM, glicina 96 mM, pH 8,3, durante 16 horas a 150 mA. La membrana de PVDF se bloqueó durante 1 hr con Marvel™ al 2% en PBS + Tween20 al 0,1% (tampón de bloqueo).

Anti-cadena ligera: HRP-anti-cadenas ligeras kappa humanas de conejo, dilución 1/5000 en tampón de bloqueo durante 1 hr; *anti-cadena pesada*: anti-cadena pesada humana de ratón, dilución 1/7000 en tampón de bloqueo durante 1 hr, seguido de HRP-anti-ratón de cabra, dilución 1/2000 en tampón de bloqueo durante 1 hr; *anti-marcador His*: anti-His6 de conejo, dilución 1/1000 en tampón de bloqueo durante 1 hr, seguido de HRP-anti-IgG de ratón de cabra, dilución 1/1000 en tampón de bloqueo durante 1 hr.

Todas las transferencias se lavaron 6 veces con 100 ml de PBS + Tween20 al 0,1% durante 10 minutos por lavado. Las transferencias se revelaron con reactivo ECL durante 1 min antes de ser expuestas a Amersham Hyperfilm, o reactivo DAB potenciado en metales durante 20-30 minutos, seguido de agua.

HPLC de fase inversa a alta temperatura

Se analizaron muestras (2 µg) en una columna C8 Poroshell de 2,1 mm a 80 °C, con un caudal de 2 ml/min y un gradiente de B al 18-38% a lo largo de 4 min. A = TFA al 0,1% en H₂O, B = TFA al 0,065% en IPA:MeOH 80:20. La detección se realiza mediante absorción a 214 nm.

ELISA

Los rendimientos de Fab-dAb se midieron empleando un ELISA de "sandwich". Brevemente, el Fab-dAb se capturó con un anticuerpo anti-CH1 y después se reveló con un anti-kappa-HRP.

FACS

Se incubaron muestras (mFabD-didAb) con HSA marcado con FITC 5 µg/ml (isotiocianato de fluoresceína) durante 45 min. Las incubaciones de muestra/HSA-FITC después se añadieron a células T CD4+ de ratón activadas y se incubaron durante 45 min más. Las células se lavaron con PBS y la fluorescencia asociada a las células se midió mediante FACS (clasificación de células activada por fluorescencia).

Ejemplo 3: Generación de anticuerpos anti-albúmina

Se inmunizaron conejos ½ lop con albúmina del suero humana Chromapure recombinante (adquirida en Jackson). Los conejos recibieron 3 inmunizaciones de 100 µg de proteína HSA por vía subcutánea, la primera inmunización en adyuvante de Freund completo y las posteriores inmunizaciones en Freund incompleto. Los anticuerpos 1 y 2, 646, 647, y 649 que se unen a la albúmina del suero humana, de ratón y de rata se aislaron empleando los métodos descritos en el documento WO04/051268. Los genes para el dominio variable de cadena pesada (VH) y para el dominio variable de cadena ligera (VL) de los anticuerpos 1 y 2 se aislaron y se secuenciaron después de una clonación por medio de una PCR de transcripción inversa.

5 Las secuencias injertadas en la cadena ligera fueron subclonadas en el vector de expresión de cadena ligera de conejo pVRbcK que contiene el ADN que codifica la región constante C-Kappa de conejo. Las secuencias injertadas en la cadena pesada fueron subclonadas en el vector de expresión de cadena pesada de conejo pVRbHFab que contiene el ADN que codifica la región constante de cadena pesada de Fab' de conejo. Los plásmidos se cotransfectaron en células CHO y los anticuerpos producidos se seleccionaron para la afinidad y la unión a la albúmina (tabla 1). Las transfecciones de células CHO se llevaron a cabo usando el procedimiento de Lipofectamine™ 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, nº de catálogo 11668).

Generación de los anticuerpos de dominio humanizados dAbL1, dAbH1, dAbL2 y dAbH2

10 Se diseñaron regiones VL y VH humanizadas empleando marcos de aceptores de región V humanos y restos donadores en las regiones de marco. Se diseñó una región VL injertada (L1 (SEQ ID NO:53) y L2 (SEQ ID NO:55)) y una región VH (H1 (SEQ ID NO:52) y H2 (SEQ ID NO:54)) para cada uno de los anticuerpos 1 y 2, respectivamente, y se introdujeron genes mediante ensamblaje de oligonucleótidos y mutagénesis de PCR. Los anticuerpos de dominio injertados y sus CDR se muestran en la figura 5.

Tabla 1: Afinidades de anticuerpos anti-albúmina

	como Fab de conejo		como IgG humanizada		
	HSA	SA murina	SA humana	SA murina	SA de rata
	nM	nM	nM	nM	nM
Anticuerpo 1 (Anticuerpo 645)	0,31	2,6	0,82	2,9	7,9
Anticuerpo 2 (Anticuerpo 648)	0,33	12	0,13	23	54
Anticuerpo 646	0,14	1,6	0,57	1,7	4,5
Anticuerpo 647	0,60	3,6	1,3	26	10
Anticuerpo 649	0,54	13	0,32	17	44

15

Datos comparativos E4: Análisis de FabB-dAb expresados en células de mamífero

Se produjeron construcciones de FabB-dAb según se describió en los métodos y se ensayaron los sobrenadantes procedentes de células HEK293 transfectadas que contenían los FabB-dAb directamente en BIAcore.

20 Se realizaron análisis cinéticos para evaluar la interacción de HSA con las construcciones FabB-dAb. Estos consistieron en dAbL1, dAbH2 o dAbL3 condensado con el extremo C-terminal de CH1 de FabB (véase la figura 6). El FabB-dAbL1 tiene mayor afinidad por HSA, $K_D = 170$ nM, que el FabB-dAbL3, $K_D = 392$ nM. Se demostró que FabB-dAbH2 posee la peor afinidad hacia HSA, $K_D = 1074$ nM, véase la tabla 2.

Tabla 2

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

25 La afinidad y los parámetros cinéticos se determinaron para la unión de HSA a FabB condensados con dAbL1, dAbH2 o dAbL3. Los datos muestran el valores promedio ± PEE (para FabB-dAbL1 y FabB-dAbH2, n = 4; para FabB-dAbL3, n = 2).

Una SDS-PAGE y una análisis de la transferencia Western de las proteínas FabB-dAb confirmaron que los FabB-dAb producidos tenían el tamaño esperado.

30 **Ejemplo 5: Análisis de FabB-didAb expresados en células de mamífero**

Se produjeron construcciones de FabB-didAb según se describió en los métodos y se ensayaron los sobrenadantes

procedentes de células HEK293 transfectadas que contenían los didAb directamente en BIAcore.

Se realizaron más análisis empleando construcciones de didAb, en las que dAb individuales se condensan con los extremos C-terminales pesado y ligero de Fab. Las construcciones en las que el didAb procede de un apareamiento de dominios variables pesado y ligero naturales mostraron una notable mejoría en la afinidad, comparado con el único dAb por sí solo (tabla 2 y 3). La fusión de didAb que consistía en dos dAbL1 no mostró mejoría en la afinidad frente a la observada para el dAbL1 individual (los datos no se muestran).

Tabla 3

Construcción	k_a ($\times 10^4 M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-3} s^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} M$)
FabB-didAb, -dAbL1 (CK-G4Sx2) y dAbH1 (CH1-G4Sx2)	1,78	0,16	9
FabB-didAb, -dAbL2 (CK-G4Sx2) y dAbH2 (CH1-G4Sx2)	0,54	0,21	39

La afinidad y los parámetros cinéticos se determinaron para la unión de HSA a FabB condensados con dAbL1 y dAbH1 o dAbL2 y dAbH2.

Una SDS-PAGE de las proteínas de FabB-didAb confirmó que los FabB-didAb se expresaban bien y que tenían el tamaño esperado (véase la figura 4a). Nótese que este gel de SDS-PAGE es de las proteínas totales expresadas por la célula.

Ejemplo 6 (incluye datos comparativos)

15 Análisis de FabA-dAb purificados

Se construyeron plásmidos para la expresión de los Fab-dAb, Fab'A-dAbL3 (CK-SG₄SE) Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA]₂) en *E. coli* como se describe en los métodos. Los Fab-dAb se expresaron hacia el periplasma de *E. coli* y se purificaron hasta la homogeneidad según se describe en los métodos. La pureza de los Fab-dAb se evaluó mediante HPLC en fase inversa de alta temperatura, SDS-PAGE y análisis de la transferencia Western. Los Fab-dAb también se evaluaron para la unión al antígeno mediante Biacore.

HPLC de fase inversa a alta temperatura

Una HPLC de fase inversa realizada como se describe en los métodos produjo un análisis cuantitativo de todas las especies contenidas en FabA-dAbL3 (CK-SG₄SE) y FabA-dAbL3 (CK-G[APAPA]₂). El porcentaje de cada especie presente se indica en la tabla 4.

25 **Tabla 4: Cuantificación de las especies presentes en lotes de Fab-dAb**

Especies	Fab'A-dAbL3 (CK-SG ₄ SE)	Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA] ₂)
Pico 1	0,6%	1,8%
Pico 2	0,6%	0,0%
Pico 3	1,0%	0,3%
Pico 4	0,9%	0,8%
Pico de Fab-dAb	85,5%	92,9%
Pico de di-Fab-dAb	11,5%	4,2%

SDS-PAGE

Se prepararon muestras de Fab-dAb bajo condiciones reducidas y no reducidas y se ensayaron en un gel como se describe en los métodos. El gel se tiñó con Coomassie. El perfil de bandas de ambas muestras de Fab-dAb, Fab'A-dAbL3 (CK-SG₄SE) y Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA]₂), se corresponde bien con el perfil observado mediante una HPLC de fase inversa a alta temperatura (figura 3).

Análisis de la transferencia Western

Muestras de Fab-dAb se sometieron a una SDS-PAGE no reducida, seguida de un análisis de la transferencia

Western con anticuerpos anti-cadena ligera y anti-cadena pesada, según se describe en los métodos. Esto confirmó que el dAb se encontraba en la cadena ligera del Fab y que la cadena pesada no estaba modificada en ambas muestras (figura 4). También demostró que todas las bandas detectadas mediante la SDS-PAGE no reducida teñida con Coomassie son productos relacionados con Fab-dAb.

5 *Biacore*

Se empleó un análisis cinético mediante SPR, según se describe en los métodos, para evaluar la unión de la albúmina del suero humana a Fab'A-dAbL3 (CK-SG₄SE) y Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA]₂). Los resultados en la tabla 5 demuestran que ambas construcciones son capaces de unirse a la albúmina del suero humana con una afinidad similar (K_D) de aproximadamente 1 μ M.

10 **Tabla 5**

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

Otros análisis cinéticos demostraron que todas las construcciones de fusión conservaban las características de interacción del FabA original hacia IL-1 β , tabla 6, observándose solo pequeñas diferencias en los parámetros cinéticos y de afinidad.

15 **Tabla 6**

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

El potencial para cada construcción para unirse simultáneamente tanto con la albúmina del suero humana como con el antígeno de IL-1 β se evaluó capturando cada construcción sobre la superficie del chip detector antes de llevar a cabo 3 inyecciones distintas de 3 min con albúmina del suero humana 5 μ M o IL-1 β 100 nM, o una disolución mixta de albúmina del suero humana 5 μ M y IL-1 β 100 nM. Para cada construcción de Fab-dAb, la respuesta observada para la disolución de HSA/IL-1 β combinada fue casi idéntica a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes (véase la tabla 7). Esto demuestra que los Fab-dAb son capaces de una unión simultánea de ambas IL-1 β y albúmina del suero humana, y que la unión de IL-1 β o de la albúmina del suero humana no inhibe la interacción de la otra sustancia. El FabA original solo se une a IL-1 β , con una unión desdeñable a la albúmina del suero humana.

Tabla 7

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

La anterior tabla muestra la respuesta de unión (RU) observada para cada construcción después de inyecciones distintas de HSA o IL-1 β , o una inyección de HSA y IL-1 β premezclados. En cada caso, la concentración final fue de 5 μ M para el HSA y de 100 nM para la IL-1 β . La suma de las respuestas individuales de HSA e IL-1 β se muestra entre paréntesis.

5 Ejemplo 7: FabA-didAb

Expresión de FabA-didAb en *E. coli*

Se expresaron fusiones FabA-dAb y FabA-didAb que terminan con un marcador de histidina C-terminal (marcador HIS6) en *Escherichia coli*. Después de una extracción periplásmica, las proteínas de fusión de dAb se purificaron por medio del marcador His6 C-terminal. La expresión del Fab se analizó mediante análisis de la transferencia Western de un gel no reducido con anticuerpos anti-CH1 y anti-cKappa. Los FabA-dAb y FabA-didAb se expresaron como proteínas de longitud completa y se demostró que reaccionaban con ambos reactivos de detección de anticuerpos.

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

Se realizaron más análisis para caracterizar la unión de HSA a las construcciones de FabA con los que estaban condensados uno o más dAb. Se realizaron ensayos de unión con una diversidad de construcciones, en las que dAbL3 o dAbH4 están condensados a la cadena ligera o pesada del FabA (véase la tabla 8 para detalles de las construcciones y un resumen de los datos de unión). Mientras que se observó que las construcciones que portan solo dAbH4, tanto sobre la cadena ligera como sobre la cadena pesada, se unen a HSA con una afinidad comparativamente mala (aproximadamente 9 μ M y 3 μ M, respectivamente), se observó una afinidad de unión mayor para las construcciones que portan dAbL3, como una fusión única (en la cadena ligera o pesada) o en compañía de un segundo dAb (dAbL3 o dAbH4) en la cadena opuesta.

Tabla 8

Construcción	k_a ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} \text{ M}$)
FabA	-	-	no
FabA-dAbL3 (LC-SG4SE)	4,46	16,2	363
FabA-dAbH4 (LC SG4SE)	-	-	9142
FabA-dAbL3 (HC-DKTHTS)	8,24	15,4	187
FabA-dAbH4 (HC-DKTHTS)	-	-	2866
FabA-didAb, -dAbL3 (LC-SG4SE) y -dAbL3 (HC-DKTHTS)	3,00	15,1	502
FabA-didAb, -dAbL3 (LC-SG4SE) y -dAbH4 (HC-DKTHTS)	4,36	16,3	373

Se determinó la afinidad y los parámetros cinéticos para la unión de HSA a FabA que portan dAbL3 o dAbH4 sobre la cadena ligera (LC) o sobre la cadena pesada (HC) o sobre ambas, según se indica. No se detectó unión (no) de HSA al FabA original. La cinética de interacción para la unión de HSA al FabA con (dAbH4 sobre HC) o (dAbH4 sobre LC) fue demasiado rápida para poder determinarse y, por tanto, se determinó la afinidad (KD) a partir de la unión en estado estacionario.

Ejemplo 8: Expresión y purificación de FabB-didAb

Expresión en mamíferos

Antes de la transfección, se lavaron células CHO-XE en disolución salina equilibrada de Earle (EBSS), se sedimentaron y se resuspendieron en EBSS a 2×10^8 células/ml. Se añadieron los plásmidos de cadena pesada y ligera a las células a una concentración total de 400 μ g. Se emplearon los parámetros eléctricos optimizados para 800 μ l de mezcla de células/ADN en el electroporador del laboratorio de los inventores para la transfección. Las células transfectadas se trasladaron directamente a 1 l de medio CD-CHO suplementado con Glutamax, HT y disolución antibiótica y antimicótica. Las células se incubaron con agitación a 37 °C durante 24 horas y después se cambiaron a 32 °C. Se añadió butirato de sodio 3 mM en el día 4. Los sobrenadantes se recolectaron en el día 14 mediante centrifugación a 1500 x g para eliminar las células. Los niveles de expresión se determinaron mediante ELISA.

Concentración en el sobrenadante de la expresión en mamíferos

Los sobrenadantes de mamífero que contenían aproximadamente 55 µg/ml de FabB-didAb, según se evalúa mediante ELISA, se concentraron desde 1,8 l a 200 ml empleando un concentrador Minisette equipado con una membrana de poliétersulfona (PES) con un límite de exclusión molecular de 10 kDa.

5 Purificación en proteína G

Los sobrenadantes concentrados se aplicaron a una columna Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1, y el material unido se eluyó con glicina/HCl 0,1 M, pH 2,7. El pico de elución se recogió y el pH se ajustó a aproximadamente pH 7 con Tris/HCl 2 M, pH 8,8. Las eluciones con pH ajustado se concentraron hasta 1 mg/ml y se diafiltraron hacia fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1, empleando una membrana PES de límite de exclusión molecular de 10 kD.

SDS-PAGE

Las muestras se diluyeron con agua cuando fue necesario y después se añadieron, a 26 µl, 10 µl de 4X tampón de ensayo de muestras LDS. Para las muestras no reducidas, se añadieron 4 µl de NEM 100 mM, y para las muestras reducidas se añadieron 4 µl de 10X de agente reductor. Las muestras se agitaron en vórtice, se incubaron a 85 °C durante 5 mins, se enfriaron y se centrifugaron a 12500 rpm durante 30 seg. Las muestras preparadas se cargaron en un gel de SDS tris/glicina acrilamina al 4-20% y se ensayaron durante 110 min a 125 V. Los geles se tiñeron con tinción de proteínas de azul de Coomassie.

ELISA

Los rendimientos de Fab-didAb se midieron empleando un ELISA de "sandwich". Brevemente, el Fab-didAb se capturó con un anticuerpo anti-CH1 y después se reveló con un anti-kappa-HRP.

SDS-PAGE

Se prepararon muestras de FabB y FabB-didAb bajo condiciones reducidas y no reducidas, se separaron en un gel y se tiñeron como se describe en los métodos. Véase la figura 9.

25 Ejemplo 9: Ensayo de estabilidad térmica Thermofluor con FabB-Fv

Se ensayaron muestras (1 µl de muestra a aproximadamente 1 mg/ml, 8 µl de PBS y 1 µl de 30x disolución madre de tinte fluorescente naranja Sypro) por cuadruplicado en placas de 384 pocillos. La placa se calienta desde 20-99°C empleando un sistema de PCR a tiempo real rápido 7900HT y se midió la fluorescencia (excitación a 490 nm, emisión a 530 nm). Los resultados se muestran en la tabla D y en la figura 10.

30 Tabla 9

	T_m °C (Fab)	T_m °C (Fv)
FabB-didAb,	81,9 ± 0,6	68,5 ± 0,5
-dAbL1(CK-G ₄ Sx2) y		
-dAbL1(CH1-G ₄ Sx2)		
FabB-didAb,	82,4 ± 0,2	70,6 ± 0,8
-dAbL2(CK-G ₄ Sx2) y		
-dAbL2(CH1-G ₄ Sx2)		

Ejemplo 10: Ensayo de estabilidad de agregación de FabB-Fv

Se incubaron muestras a 1 mg/ml en PBS a 25 °C con agitación en vórtice a 1400 rpm. La absorbancia se mide a 595 nm. Esta absorbancia es debida a la luz dispersada por partículas y puede correlacionarse con la agregación de la muestra. Ambos FabB-645Fv (G₄Sx2) y FabB-648Fv (G₄Sx2) son tan resistentes a la agregación como FabB por sí solo. Todos son más resistentes a la agregación que el control de IgG (figura 12).

Ejemplo 11: Dependencia del pH de la unión de Fab-Fv a HSA

Se determinaron las afinidades de unión para las interacciones de las construcciones de Fab-Fv con HSA según se

describe en los métodos, excepto que los tampones de ensayo a pH 5,0, 5,5, 6,0 y 7,0 se crearon mezclando ácido cítrico 40 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05% en v/v, y bifosfato de sodio 80 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05% en v/v para producir el pH deseado.

- 5 La afinidad de FabB-645Fv (G₄Sx2) por HSA no se vio afectada por el pH desde 7,4 (pH patrón del ensayo) a 5,0. La afinidad del FabB-648Fv (G₄Sx2) por HSA sí se ve afectada por el pH y se produce una pérdida en aproximadamente 10 veces de la afinidad entre pH 7,4 y pH 5,0.

Tabla 10

	<i>K_D</i> (x 10 ⁻⁹ M)			
	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,5	pH 5,0
FabB-645Fv(G ₄ Sx2)	13,3	12,5	10,7	7,1
FabB-648Fv(G ₄ Sx2)	3,3	11,1	24,1	47,8

Ejemplo 12: PK murino *in vivo* de FabB-Fv

- 10 Se determinó la farmacocinética de FabB-645Fv (G₄Sx2) y FabB-648Fv (G₄Sx2) en ratones BALB/c macho tras una única administración a 10 mg/kg por vía subcutánea (sc) o intravenosa (iv). Se dosificaron seis ratones para cada construcción y vía de administración. Se recogieron muestras de sangre en serie (30 µl) de la vena de la cola en los siguientes momentos: 1, 4, 8, 24, 48, 72, 102 y 168 horas después de la administración subcutánea, y 30 minutos, 1, 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración intravenosa. La sangre recogida se dispensó en una microcubeta Sarstedt CB300Z con activador de la coagulación para la separación del suero, y se dejó a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos. La microcubeta después se centrifugó a 20 °C a 10.000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el suero y se conservó congelado antes del análisis. Se evaluó la concentración de FabB-645Fv (G₄Sx2) o FabB-648Fv (G₄Sx2) en las muestras de suero mediante ELISA. Brevemente, placas Nunc Maxisorb Immunomodule Plates se revistieron con hOX40-Fc en PBS y se bloquearon con BSA al 1% en PBS. Las muestras de suero y los patrones se diluyeron en BSA al 1% en PBS y se aplicaron a la placa durante 1 hora. La placa se lavó con PBS y se aplicó el anticuerpo revelador de conjugado de HRP anti-kappa humano de cabra en BSA al 1% en PBS durante 1 hora. La placa se lavó y después se reveló con sustrato TMB, seguido de la detención con ácido sulfúrico 2,5 M. Se midió la absorbancia a 630 nm y se determinaron las concentraciones a partir de la curva patrón.

- 25 Ambos FabB-645Fv (G₄Sx2) y FabB-648Fv (G₄Sx2) presentan una semivida larga en plasma (figura 13). Las semividas de FabB-645Fv (G₄Sx2) son de 71 h sc y 62 h iv, y de FabB-648Fv (G₄Sx2) son de 25 h sc y 30 h iv.

Ejemplo 13: Estudio de la eficacia *in vivo* de FabB-Fv

Se realizó un estudio para investigar si FabB-645Fv y FabB-648Fv son eficaces *in vivo*. Brevemente, esto implicó la dosificación en estado estacionario de ratones HuSCID y la lectura consistió en la prevención del injerto de células T.

- 30 Ratones CB17 SCID fueron dosificados con una dosis de carga por vía subcutánea en el día -2 de 2,475 mg/kg de FabB-645Fv o FabB-648Fv o FabB-PEG40k o PBS. En cada día posterior e incluyendo el día 10, fueron dosificados con una dosis de mantenimiento por vía subcutánea de 0,75 mg/kg de FabB-645Fv o FabB-648Fv o FabB-PEG40k o PBS. Cada grupo de dosificación consistió en 9-10 ratones. En el día -1, todos los ratones fueron tratados con 0,87 mg/ratón de anticuerpo anti-TM-β1 murino de rata para abrogar la actividad de las células asesinas naturales. En el día 0, todos los ratones recibieron una inyección interperitoneal de 8 x 10⁶ células mononucleares de sangre periférica humanas. En el día 14, los ratones se sacrificaron y se extrajeron la sangre, el bazo y un lavado peritoneal. Las muestras se analizaron mediante FACS para células T CD4⁺ y CD8⁺. Los conjuntos de datos se analizaron mediante un Anova de una sola vía con una comparación posensayo de Dunnett. Todas las construcciones de ensayo FabB-645Fv, FabB-648Fv y FabB-PEG40k fueron igualmente eficaces en todos los compartimentos ensayados, es decir, sangre, peritoneo y bazo (figuras 14A, B y C).

Ejemplo 14: Mutaciones de FabB-645Fv para cambiar la afinidad de 645Fv por la albúmina

- 45 Se introdujeron mutaciones puntuales en restos seleccionados en las CDR de la cadena pesada de la porción 645Fv de FabB-645dsFv (S3xG₄S) mediante PCR mutagénica. Por ejemplo, I50A es una sustitución de Ile 50 por Ala. Las diversas mutaciones se indican en la siguiente tabla 11. Se evaluó la afinidad de los mutantes de Fab-645Fv por la albúmina humana mediante BIAcore, según se describe en los métodos. Todas las mutaciones dieron como resultado una afinidad reducida o no alterada para la albúmina humana.

Tabla 11

Mutación cadena pesada de Fv	Albúmina	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
I50A	HSA	3,12E+04	1,90E-03	60,9
T56A	HSA	4,65E+04	3,78E-04	8,12
T95A	HSA	2,81E+04	2,64E-03	94,0
V96A	HSA	2,81E+04	6,42E-04	22,9
P97A	HSA	4,60E+04	1,26E-02	275
G98A	HSA	4,73E+04	2,71E-04	5,73
Y99A	HSA	4,71E+04	4,79E-04	10,2
S100A	HSA	3,94E+04	1,44E-03	36,6
T100aA	HSA	3,60E+05	1,86E-02	51,6
Y100cA	HSA	1,23E+04	1,07E-03	87,0
I50A y T95A	HSA	2,12E+04	9,94E-03	468
I50A y G98A	HSA	1,79E+04	6,96E-03	389
I50A y Y99A	HSA			>3500
T56A y T95A	HSA	2,84E+04	8,57E-04	30,1
T56A y G98A	HSA	2,40E+04	3,68E-03	153
T56A y Y99A	HSA	2,24E+04	1,49E-02	664

Ejemplo 15: Longitud del conector 1-5 Gly4Ser entre Fab y Fv

Construcción de plásmidos de fusión de FabB-645Fv para la expresión en células de mamífero

- 5 Se ensamblaron FabB-645Fv con un conector SGGGGS, SGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGGS, SGGGSGGGSGGGSGGGGS o SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS entre los extremos C-terminales del Fab y los extremos N-terminales del Fv mediante PCR y después se clonaron en vectores de expresión en mamíferos bajo el control del promotor HCMV-MIE y una secuencia poliA de SV40E. Los plásmidos de cadena pesada y ligera pertinentes se aparearon para la expresión en células de mamífero.

10 *Expresión en mamíferos de FabB-645Fv (1-5xG₄S)*

- Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de cadena pesada y ligera utilizando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 24 µg del plásmido de cadena pesada + 24 µg del plásmido de cadena ligera con 120 µl de 293fectin + 4080 µl de medio Optimem durante 20 mins a temperatura ambiente. Después se añadió la mezcla a 60 x 10⁶ células HEK293 en 60 ml de suspensión y se incubaron durante 4 días con agitación a 37 °C. Todas las construcciones fueron igualmente bien expresadas.

Purificación en proteína G

- Las suspensiones de expresión en mamíferos se aclararon mediante centrifugación, y los sobrenadantes se concentraron hasta aproximadamente 1,8 ml empleando concentradores de centrifugación de límite de exclusión molecular de 10 kDa. Los sobrenadantes concentrados se centrifugaron a 16000 x g durante 10 min para eliminar cualquier precipitado y después se cargaron 1,5 ml en columnas HiTrap Protein-G de 1 ml (GE Healthcare) a 1 ml/min. Las columnas se lavaron 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 (2 ml) se recogió y el pH se ajustó a aproximadamente pH 5 con 250 µl de acetato de sodio 1 M. Las eluciones con pH ajustado se diafiltraron hacia fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1, empleando concentradores de centrifugación de límite de exclusión molecular de 10 kDa y se concentraron hasta aproximadamente 250 µl. Todas las construcciones presentaron unos perfiles de purificación similares y las concentraciones finales fueron de 0,5-1,1 mg/ml.

Afinidad de FabB-645Fv (1-5xG₄S) por la albúmina

5 Se determinaron las afinidades de las construcciones de FabB-645Fv (1-5xG₄S) purificadas por la albúmina humana y de ratón según se describe en los métodos. Las diferentes longitudes de conector del Fv de 1 a 5 xGly4Ser entre los extremos C-terminales del Fab y los extremos N-terminales del Fv no afectaron a la afinidad del 645Fv por la albúmina humana o de ratón.

Tabla 12

	Albúmina	KD (nM)	Albúmina	KD (nM)
FabB-645Fv (1xG ₄ S)	Humana	8,77	Ratón	2,18
FabB-645Fv (2xG ₄ S)	Humana	6,72	Ratón	8,01
FabB-645Fv (3xG ₄ S)	Humana	9,87	Ratón	8,92
FabB-645Fv (4xG ₄ S)	Humana	7,90	Ratón	7,24
FabB-645Fv (5xG ₄ S)	Humana	3,90	Ratón	6,09

Análisis de SDS-PAGE de FabB-645Fv (1-5xG₄S) purificado

10 Se prepararon muestras de FabB-645Fv (1-5xG₄S) bajo condiciones reducidas y no reducidas, se separaron en un gel y se tiñeron como se describe en los métodos. Véase la figura 15.

Análisis de exclusión molecular de FabB-645Fv (1-5xG₄S) purificado

Se analizaron muestras de FabB-645Fv (1-5xG₄S) para el tamaño en una columna Superdex200 10/300GL Tricorn (GE Healthcare) ensayado con un gradiente isocrático de fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, a 1 ml/min.

15 Una longitud del conector entre los extremos C-terminales del Fab y los extremos N-terminales del Fv de 1xG₄S o 2xG₄S reduce la cantidad de monómero de FabB-645Fv, al mismo tiempo que aumenta la cantidad de dímero y multímeros superiores. La cantidad de monómero es menor para la longitud del conector de 1xG₄S. Una longitud del conector entre los extremos C-terminales del Fab y los extremos N-terminales del Fv de 3xG₄S, 4xG₄S o 5xG₄S aumenta la cantidad de monómero de FabB-645Fv, al mismo tiempo que disminuye la cantidad de dímero y multímeros superiores, siendo los niveles similares para las tres longitudes de conector (figura 16).

Tabla 13

	Monómero	Dímero	Multímeros superiores
FabB-645Fv (1xG ₄ S)	5%	47%	48%
FabB-645Fv (2xG ₄ S)	27%	38%	36%
FabB-645Fv (3xG ₄ S)	51%	32%	17%
FabB-645Fv (4xG ₄ S)	55%	30%	15%
FabB-645Fv (5xG ₄ S)	51%	31%	18%

Análisis de estabilidad térmica de Thermofluor de FabB-645Fv (1-5xG₄S) purificado

25 Se ensayaron muestras (1 µl de muestra a aproximadamente 1 mg/ml, 8 µl de PBS y 1 µl de 30x disolución madre de tinte fluorescente naranja Sypro) por cuadruplicado en placas de 384 pocillos. La placa se calienta desde 20-99°C empleando un sistema de PCR a tiempo real rápido 7900HT y se midió la fluorescencia (excitación a 490 nm, emisión a 530 nm). Los resultados se muestran en la tabla 14 y en la figura 17.

Tabla 14

	Tm °C (Fab)	Tm °C (Fv)
FabB-645Fv (1xG ₄ S)	82,8 ± 0,6	67,4 ± 0,4
FabB-645Fv (2xG ₄ S)	83,4 ± 0,3	68,7 ± 0,3
FabB-645Fv (3xG ₄ S)	83,4 ± 0,3	69,5 ± 0,6
FabB-645Fv (4xG ₄ S)	83,8 ± 0,3	71,3 ± 1,0
FabB-645Fv (5xG ₄ S)	83,8 ± 0,4	72,0 ± 0,7

Ejemplo 16: Estabilización por disulfuro del Fv en un Fab-Fv

5 *Plásmidos de fusión de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S), FabΔB-645dsFv (2xG₄S) y FabΔB-648dsFv (2xG₄S) para la expresión en células de mamífero*

Se introdujeron mutaciones puntuales en las secuencias de ADN de FabB-645Fv (2xG₄S) y FabB-648Fv (2xG₄S) en restos seleccionados en la región de marco de la cadena pesada y la cadena ligera del Fv mediante PCR mutagénica. Las mutaciones introducidas para crear un enlace disulfuro intercatenario entre las cadenas pesada y ligera del Fv fueron G44C en la cadena pesada y G100C en la cadena ligera. Además de añadir las cisteínas para crear el enlace disulfuro intercatenario en el Fv, se eliminó el disulfuro intercatenario natural entre la cadena pesada y la cadena ligera del Fab mediante PCR mutagénica cambiando las cisteínas a serinas. Los Fv que contenían un enlace disulfuro intercatenario se denominaron dsFv, y Fab que carecían de un enlace disulfuro intercatenario se denominaron FabΔ. Después, el ADN de todas estas construcciones se clonó en vectores de expresión en mamíferos bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E. Los plásmidos de cadena pesada y ligera pertinentes se aparearon para la expresión en células de mamífero.

15 *Expresión en mamíferos de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S), FabΔB-645dsFv (2xG₄S) y bΔB-648dsFv (2xG₄S)*

Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de cadena pesada y ligera utilizando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 24 µg del plásmido de cadena pesada + 24 µg del plásmido de cadena ligera con 120 µl de 293fectin + 4080 µl de medio Optimem durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla después se añadió a 60 x 10⁶ células HEK293 en 60 ml de suspensión y se incubó durante 4 días con agitación a 37 °C. Todas las construcciones fueron igualmente bien expresadas.

20 *Purificación con proteína G de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S), FabΔB-645dsFv (2xG₄S) y bΔB-648dsFv (2xG₄S)*

Las suspensiones de expresión en mamíferos se aclararon mediante centrifugación, y los sobrenadantes se concentraron hasta aproximadamente 1,8 ml empleando concentradores de centrifugación de límite de exclusión molecular de 10 kDa. Los sobrenadantes concentrados se centrifugaron a 16000 x g durante 10 min para eliminar cualquier precipitado y después se cargaron 1,5 ml en columnas HiTrap Protein-G de 1 ml (GE Healthcare) a 1 ml/min. Las columnas se lavaron 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 (2 ml) se recogió y el pH se ajustó a aproximadamente pH 5 con 250 µl de acetato de sodio 1 M. Las eluciones con pH ajustado se diafiltraron hacia fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1, empleando concentradores de centrifugación de límite de exclusión molecular de 10 kDa y se concentraron hasta aproximadamente 250 µl. Todas las construcciones presentaron unos perfiles de purificación similares y las concentraciones finales fueron de 0,5-0,8 mg/ml.

35 *Afinidad de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S), FabΔB-645dsFv (2xG₄S) y bΔB-648dsFv (2xG₄S) por la albúmina*

Se determinaron las afinidades de las construcciones FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S) FabΔB-645dsFv (2xG₄S), FabΔB-648dsFv (2xG₄S) purificadas para la albúmina humana y de ratón según se describe en los métodos. La estabilización con disulfuro del Fv no produjo ningún efecto o aumentó ligeramente la afinidad del Fv para la albúmina humana o de ratón.

Tabla 15

	Albúmina	KD (nM)	Albúmina	KD (nM)
FabB-645Fv (2xG ₄ S)	Humana	17,5	Ratón	24,7
FabB-645dsFv (2xG ₄ S)	Humana	12,6	Ratón	14,0
FabΔB-645dsFv (2xG ₄ S)	Humana	8,3	Ratón	12,2
FabB-648Fv (2xG ₄ S)	Humana	9,4	Ratón	42,4
FabB-648dsFv (2xG ₄ S)	Humana	3,1	Ratón	59,6
FabΔB-648dsFv (2xG ₄ S)	Humana	8,3	Ratón	59,8

Análisis de SDS-PAGE de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S), FabΔB-645dsFv (2xG₄S) y bΔB-648dsFv (2xG₄S) purificados

- 5 Se prepararon muestras de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S) FabΔB-645dsFv (2xG₄S), FabΔB-648dsFv (2xG₄S) purificados bajo condiciones reducidas y no reducidas, se separaron sobre un gel y se tiñeron según se describe en los métodos. Véase la figura 18.

Análisis de exclusión molecular de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S), FabΔB-645dsFv (2xG₄S) y bΔB-648dsFv (2xG₄S) purificados

- 10 Se analizaron muestras de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S) FabΔB-645dsFv (2xG₄S), FabΔB-648dsFv (2xG₄S) purificados para determinar el tamaño en una columna Superdex200 10/300GL Tricorn (GE Healthcare) revelada con un gradiente isocrático de fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, a 1 ml/min.

- 15 La introducción de un enlace disulfuro intercatenario en el Fv de un 645Fv o 648Fv aumentó la cantidad de especies monoméricas de Fab-Fv, comparado con el Fab-Fv en el que el Fv no presenta un disulfuro intercatenario. La eliminación del enlace disulfuro intercatenario natural de la parte Fab de un Fab-Fv solo produjo un efecto pequeño sobre la cantidad de especies monoméricas presentes (figura 19).

Tabla 16

	Monómero	Dímero	Multímeros superiores
FabB-645Fv (2xG ₄ S)	26%	38%	35%
FabB-645dsFv (2xG ₄ S)	43%	21%	37%
FabΔB-645dsFv (2xG ₄ S)	40%	25%	34%
FabB-648dsFv (2xG ₄ S)	50%	26%	24%
FabΔB-648dsFv (2xG ₄ S)	55%	24%	20%

- 20 *Análisis de estabilidad térmica de Thermofluor de FabB-645dsFv (2xG₄S), FabB-648dsFv (2xG₄S), FabΔB-645dsFv (2xG₄S) y bΔB-648dsFv (2xG₄S) purificados*

Se ensayaron muestras (1 μl de muestra a aproximadamente 1 mg/ml, 8 μl de PBS y 1 μl de 30x disolución madre de tinte fluorescente naranja Sypro) por cuadruplicado en placas de 384 pocillos. La placa se calienta desde 20-99°C empleando un sistema de PCR a tiempo real rápido 7900HT y se midió la fluorescencia (excitación a 490 nm, emisión a 530 nm).

- 25 La introducción de un enlace disulfuro intercatenario en la parte Fv de un Fab-Fv de un 645Fv o 648Fv aumentó la estabilidad térmica del Fv, comparado con el Fab-Fv en el que el Fv no presenta un disulfuro intercatenario. La eliminación del enlace disulfuro intercatenario natural de la parte Fab de un a Fab-Fv disminuyó la estabilidad térmica de la parte Fab del Fab-Fv.

Tabla 17

	Tm °C (Fab)	Tm °C (Fv)
FabB-645Fv (2xG ₄ S)	81,9 ± 0,6	68,5 ± 0,5
FabB-645dsFv (2xG ₄ S)	83,6 ± 0,3	71,6 ± 0,3
FabΔB-645dsFv (2xG ₄ S)	79,5 ± 0,1	70,8 ± 0,6
FabB-648Fv (2xG ₄ S)	82,4 ± 0,2	70,6 ± 0,8
FabB-648dsFv (2xG ₄ S)	82,8 ± 0,3	75,0 ± 0,6
FabΔB-648dsFv (2xG ₄ S)	n.d.	73,6 ± 0,8

n.d. = no determinado. El software de análisis no pudo resolver este punto de inflexión.

Método Biacore para FabD

5 Se determinaron las afinidades de unión y los parámetros cinéticos para las interacciones de las construcciones de Fab-dAb y Fab-didAb mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) realizado en un Biacore T100 empleando 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 humano 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 de los inventores. Las muestras de Fab murino se capturaron empleando un Fab de cabra específico de F(ab')₂ murino (Jackson ImmunoResearch, 115-006-072). La inmovilización covalente del anticuerpo de captura se logró mediante la química de acoplamiento de amina convencional.

15 Cada ciclo de ensayo consistió en capturar, en primer lugar, la construcción Fab-dAb o Fab-didAb empleando una inyección durante 1 min, antes de una fase de asociación que consiste en una inyección del antígeno durante 3 min, tras lo cual se controló la disociación durante 5 min. Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con 2 x inyecciones durante 1 min de HCl 40 mM, seguido de 30 s de NaOH 5 mM. Los caudales utilizados fueron 10 µl/min para la captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación, y 10 µl/min para la regeneración.

20 Para los ensayos cinéticos, se realizó una titulación del antígeno (para la albúmina del suero humana o de ratón, generalmente 62,5 nM-2 µM, para IL-1β, 1,25-40 nM, para el receptor de la superficie celular D, 20-1,25 nM), se empleó una célula de flujo de blanco para restar la referencia, y se incluyeron inyecciones de tampón-blanco para restar la deriva y el ruido del instrumento.

25 Se determinaron los parámetros cinéticos mediante ajuste global simultáneo de los sensogramas resultantes a un modelo de unión 1:1 convencional utilizando el software de Biacore T100 Evaluation. Para ensayar la unión simultánea, se realizaron inyecciones de 3 min de HSA 5 µM o IL-1β 100 nM por separado, o una disolución mixta de HSA 5 µM y IL-1β 100 nM, sobre el Fab-dAb capturado. Se evaluó la unión simultánea de la albúmina y el receptor de la superficie celular D de la misma manera, utilizando concentraciones finales de HSA o MSA 2 µM y receptor de la superficie celular D murino 20 nM.

Ejemplo 17: Expresión en mamíferos de mFabC-mdidAb y mFabD-mdidAb

30 Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de cadena pesada y ligera utilizando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 2 µg del plásmido de cadena pesada + 2 µg del plásmido de cadena ligera con 10 µl de 293fectin + 340 µl de medio Optimem durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla después se añadió a 5 x 10⁶ células HEK293 en suspensión y se incubó durante 6 días con agitación a 37 °C.

ELISA

35 Los rendimientos de mFab-mdidAb se midieron empleando un ELISA de "sandwich". Brevemente, el mFab-mdidAb se capturó con un anticuerpo anti-CH1 y después se reveló con un anti-kappa-HRP.

Tabla 18

	Expresión en ELISA (ug/ml)
mFabD-mdidAb, -dAbL1(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	44
mFabD-mdidAb, -dAbL2(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	35
mFabC-mdidAb, -dAbL1(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	11
mFabC-mdidAb, -dAbL2(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	14

Ejemplo 18

5 Se realizaron otros análisis cinéticos para evaluar las interacciones de la albúmina del suero y OX40 humano con las fusiones FabB-didAb, -dAbL1(CK-G₄Sx2) y -dAbH1(CH1-G₄Sx2) y FabB-didAb, -dAbL2(CK-G₄Sx2) y -dAbH2(CH1-G₄Sx2) purificadas (tabla 19). Ambos FabB-didAb, -dAbL1(CK-G₄Sx2) y -dAbH1(CH1-G₄Sx2) y FabB-didAb, -dAbL2(CK-G₄Sx2) y -dAbH2(CH1-G₄Sx2) conservaron la afinidad por OX40 humano del FabB original (tabla 20).

10 El potencial de las construcciones de FabB-didAb, -dAbL1(CK-G₄Sx2) y -dAbH1(CH1-G₄Sx2) y FabB-didAb, -dAbL2(CK-G₄Sx2) y -dAbH2(CH1-G₄Sx2) para unirse simultáneamente a la albúmina del suero humano o de ratón y OX40 humano se evaluó capturando cada construcción de Fab-didAb sobre la superficie del chip detector, antes de realizar inyecciones distintas de 3 min con albúmina 2 μM (humana o de ratón) o OX40 humano 50 nM, o una disolución mixta de ambos albúmina 2 μM y OX40 50 nM. Se observó unión a HSA en ambas construcciones de Fab-didAb. Para cada construcción de Fab-didAb, la respuesta observada para la disolución de albúmina/OX40 combinada fue casi idéntica a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes (resumido en la tabla 21). Esto demuestra que los Fab-didAb son capaces de una unión simultánea a OX40 y la albúmina del suero. El FabB original se une solo a OX40, sin presentar unión significativa con la albúmina humana o de ratón.

Tabla 19

Construcción	Albúmina	k_a (x 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (x 10 ⁻⁵ s ⁻¹)	K_D (x 10 ⁻⁹ M)
FabB-didAb, -dAbL1(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	HSA	1,65	2,06	12,5
FabB-didAb, -dAbL2(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	HSA	1,80	1,24	6,92
FabB-didAb, -dAbL1(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	MSA	1,83	1,82	9,94
FabB-didAb, -dAbL2(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	MSA	ND	ND	-

La afinidad y los parámetros cinéticos se determinaron para la unión de HSA y MSA a las fusiones de Fab-didAb.

20 Tabla 20

Construcción	k_a (x 10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (x 10 ⁻⁵ s ⁻¹)	K_D (x 10 ⁻¹² M)
FabB	2,92	22,6	775
FabB-didAb, -dAbL1(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	3,58	8,54	238
FabB-didAb, -dAbL2(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	3,27	13,6	415

Afinidad y parámetros cinéticos para la unión de hOX40-Fc a las fusiones de FabB y FabB-didAb.

Tabla 21

Construcción	Analito	Unión (RU)	
FabB	HSA	2,5	
	MSA	-2,5	
	OX40	89,5	
	HSA + OX40	90,1	(92)
	MSA + OX40	86,5	(87)
FabB-didAb, -dAbL1(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	HSA	109,1	
	MSA	93,3	
	OX40	73,7	
	HSA + OX40	186,1	(182,8)
	MSA + OX40	170,3	(167)
FabB-didAb, - dAbL2(CK-G ₄ Sx2) y -dAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	HSA	50,9	
	MSA	2,4	
	OX40	52,9	
	HSA + OX40	104,2	(103,8)
	MSA + OX40	54,9	(55,3)

La anterior tabla muestra la respuesta de unión (RU) observada para cada construcción después de inyecciones distintas de HSA o MSA o hOX40-Fc, o una inyección de albúmina y hOX40-Fc premezclados. En cada caso, la concentración final fue de 2 μ M de albúmina HSA y 50 nM de hOX40-Fc. La suma de las respuestas individuales de albúmina y hOX40-Fc se muestra entre paréntesis.

Ejemplo 19

Se realizaron otros análisis cinéticos para evaluar las interacciones de la albúmina del suero y el receptor de la superficie celular D murino a mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G₄Sx2) y mdAbH1(CH1-G₄Sx2) y mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G₄Sx2) y mdAbH2(CH1-G₄Sx2) (tabla 22). Ambos mFabD-mdidAb mostraron una unión de afinidad relativamente alta a HSA ($K_D = 2,78$ nM y 8,97 nM, respectivamente). Los mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G₄Sx2) y mdAbH2(CH1-G₄Sx2) también se unieron a MSA con una afinidad similar ($K_D = 22$ nM), aunque no se observó unión a MSA para mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G₄Sx2) y mdAbH1(CH1-G₄Sx2). Ambos mFabD-mdidAb conservaron la afinidad por el receptor de la superficie celular D murino del mFabD original (tabla 23).

Se evaluó el potencial de mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G₄Sx2) y mdAbH1(CH1-G₄Sx2) y mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G₄Sx2) y mdAbH2(CH1-G₄Sx2) para unirse simultáneamente a la albúmina del suero humana o de ratón y al receptor de la superficie celular D murino capturando cada construcción de mFab-mdidAb sobre la superficie del chip detector, antes de realizar inyecciones distintas de 3 min con albúmina 2 μ M (humana o de ratón) o receptor de la superficie celular D 20 nM, o una disolución mixta de ambos albúmina 2 μ M y receptor de la superficie celular D 20 nM. De nuevo, se observó unión de HSA para ambas construcciones de mFab-mdidAb, mientras que solo mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G₄Sx2) y mdAbH2(CH1-G₄Sx2) se unió a MSA. Para cada construcción de mFab-mdidAb, la respuesta observada para la disolución de albúmina/receptor de la superficie celular D combinada fue casi idéntica a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes (resumido en la tabla 24). Esto demuestra que los mFab-mdidAb son capaces de una unión simultánea al receptor de la superficie celular D y la albúmina del suero. El mFabD original solo se une al receptor de la superficie celular D, sin unión significativa con la albúmina humana o de ratón.

Tabla 22

Construcción	Albúmina	k_a ($\times 10^4 M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-5} s^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} M$)
mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	HSA	1,01	2,82	2,78
mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	HSA	1,19	10,69	8,97
mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	MSA	-	-	-
mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	MSA	1,03	22,73	22,06

La afinidad y los parámetros cinéticos se determinaron para la unión de HSA y MSA a mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G₄Sx2) y mdAbH1(CH1-G₄Sx2) y mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G₄Sx2) y mdAbH2(CH1-G₄Sx2).

5 **Tabla 23**

Construcción	k_a ($\times 10^5 M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-5} s^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-12} M$)
mFabD	1,98	2,50	126
mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	2,01	4,67	233
mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	3,62	6,36	176

Afinidad y parámetros cinéticos para la unión del receptor de la superficie celular D murino-Fc a mFabD, mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G₄Sx2) y mdAbH1(CH1-G₄Sx2) y mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G₄Sx2) y mdAbH2(CH1-G₄Sx2).

10 **Tabla 24**

Construcción	Analito	Unión (RU)	
mFabD	receptor D	61,3	
	HSA	0,9	
	MSA	-1,1	
	receptor D + HSA	62,9	(62,2)
	receptor D + MSA	59,2	(60,2)
mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH1(CH1-G ₄ Sx2)	receptor D	39,8	
	HSA	59,9	
	MSA	-0,6	
	receptor D + HSA	101,2	(99,7)
	receptor D + MSA	39,9	(39,2)
mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G ₄ Sx2) y mdAbH2(CH1-G ₄ Sx2)	receptor D	42,6	
	HSA	61,9	
	MSA	43,5	
	receptor D + HSA	105,3	(104,5)
	receptor D + MSA	86,3	(86,1)

La anterior tabla muestra la respuesta de unión (RU) observada para cada construcción después de inyecciones distintas de HSA o MSA o receptor de la superficie celular D murino-Fc, o una inyección de albúmina y receptor de la superficie celular D murino-Fc premezclados. En cada caso, la concentración final fue de 2 μ M de albúmina HSA y de 20 nM de receptor de la superficie celular D murino-Fc. La suma de las respuestas individuales de la albúmina y el receptor de la superficie celular D murino-Fc se muestra entre paréntesis.

Ejemplo 20

Se realizaron otros análisis para evaluar la interacción simultánea de mFabD-mdidAb, -mdAbL1(CK-G₄Sx2) y mdAbH1(CH1-G₄Sx2) o mFabD-mdidAb, -mdAbL2(CK-G₄Sx2) y mdAbH2(CH1-G₄Sx2) con albúmina del suero y receptor de la superficie celular D murino expresado sobre la superficie celular. Ambos mFabD-mdidAb fueron capaces de unirse a HSA marcado con FITC y el receptor de la superficie celular X expresado sobre la superficie celular de células T murinas activadas simultáneamente (figura 11). El mFabD fue capaz de unirse al receptor de la superficie celular X expresado sobre la superficie celular de células T murinas activadas (los datos no se muestran), pero no se unió al HSA marcado con FITC.

Ejemplo 21: Expresión y purificación de FabB-645dsFv (3xG4S)

15 Expresión en mamíferos

Antes de la transfección, $1,4 \times 10^{10}$ células CHO-SV se lavaron en disolución salina equilibrada de Earl ("Earls Balanced Salts Solution", EBSS) y se sedimentaron. Se añadieron 7 mg de ADN de plásmido de cadena pesada y 7 mg de cadena ligera a las células. Se añadió el tampón EBBS hasta un volumen final de 10 ml. Se electroporaron 800 μ l de lo anterior por cubeta usando parámetros eléctricos optimizados en un electroporador del laboratorio de los inventores. Las células transfectadas se trasladaron directamente a 7 x 1 l de medio CD-CHO al que se le suministró glutamax, HT y disolución de antibióticos antimicóticos. Las células se incubaron, agitando a 37 °C durante 24 horas que después se desplazó a 32 °C. Se añadió butirato de sodio 3 mM en el día 4. Los sobrenadantes se recolectaron en el día 10 o 14 mediante centrifugación a 1500 x g para retirar las células. Se determinaron los niveles de expresión mediante un ensayo de proteína G.

25 Concentración en sobrenadante de mamífero

Los sobrenadantes de mamífero reunidos que contenían 15 μ g/ml de FabB-645dsFv (3xG4S) se concentraron desde 6,5 l hasta 800 ml usando un concentrador Minisette equipado con 2 x membranas de polietersulfona (PES) con un límite de exclusión de peso molecular de 10 kDa.

Purificación de proteína G

30 El sobrenadante concentrado se aplicó a 135 cm/hr a una columna de 50 ml Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, y el material unido 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 8,8. La elución con el pH ajustado se concentró hasta 7 ml y se diafiltró en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 usando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de límite de exclusión molecular de 10 kDa y una centrifugación a 4000 x g en un rotor de centrifugación.

Purificación con Superdex200

40 El eluato de proteína G concentrado y diafiltrado se aplicó a una columna XK26/60 Superdex200 (GE Healthcare) equilibrada con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. La columna se reveló con un gradiente isocrático de fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 a 30 cm/hr. Se recogieron fracciones de 5 ml y se analizaron mediante una columna Superdex200 10/300GL Tricon (GE Healthcare) revelada con un gradiente isocrático de fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 a 1 ml/min. Se reunieron las fracciones que solo contenían el monómero y se concentraron hasta aproximadamente 10 mg/ml usando un concentrador Amicon Ultra-15 con una membrana de límite de exclusión de peso molecular de 10 kDa y una centrifugación a 4000 x g en un rotor de centrifugación.

Análisis SDS-PAGE de FabB-645dsFv (3xG4S)

45 Se diluyó el FabB-645dsFv (3xG4S) hasta 0,32 mg/ml con PBS, y a 26 μ l se le añadieron 10 μ l de 4X tampón de ensayo de muestras LDS (Invitrogen). Para las muestras no reducidas, se añadieron 4 μ l de NEM 100 mM, y para las muestras reducidas se añadieron 4 μ l de 10X agente reductor (Invitrogen). Las muestras se agitaron en vórtice, se incubaron a 100 °C durante 3 min, se enfriaron y se centrifugaron a 12500 rpm durante 30 s. Las muestras preparadas se cargaron, 10 μ l/2 μ g, en un gel de Tris/glicina SDS acrilamina al 4-20% y se ensayaron durante 110 min a 125 V. Los geles se tiñeron con tinte de proteínas de azul de Coomassie y se destiñeron con ácido acético al 7,5%. Véase la figura 25. Bajo condiciones reductoras y no reductoras, el FabB-645dsFv (3xG4S) fundamentalmente es una sola banda. Las dos pequeñas bandas por encima y por debajo de la banda principal en el gel no reducido son uno u otro de los enlaces disulfuro intercatenarios que no se han formado. La banda pequeña por encima de la banda principal en el gel reducido es FabB-645dsFv (3xG4S) no reducible. Véase la figura 25.

Análisis de exclusión molecular de FabB-645dsFv (3xG4S)

El FabB-645dsFv (3xG4S) se diluyó hasta 0,5 mg/ml con PBS. Se inyectaron 100 µl de esto último en una columna Superdex200 10/300GL Tricon (GE Healthcare) y se reveló con un gradiente isocrático de PBS a 1 ml/min. Los picos se detectaron mediante absorbancia a 280 nm y 214 nm. Véase la figura 26. En el cromatograma aparece un único pico simétrico con un tiempo de retención de 13,44 minutos métricos. Este tiempo de retención del pico se convirtió en un peso molecular aparente usando una curva patrón creada a partir de los tiempos de retención de patrones de filtración en gel BioRad (151-1901) ensayados bajo las mismas condiciones. El peso molecular aparente del FabB-645dsFv (3xG4S) fue de 87 kDa.

Análisis de la estabilidad térmica del FabB-645dsFv (3xG4S)

- 10 Para medir la estabilidad térmica, el FabB-645dsFv (3xG4S) se diluyó hasta 1 mg/ml con PBS. Por cuadruplicado, a 1 µl de esta muestra diluida se le añadieron 8 µl de PBS y 1 µl de 30x disolución madre de tinte fluorescente naranja Sypro en una placa de 384 pocillos. La placa se calentó desde 20-99 °C usando un sistema de PCR a tiempo real rápido 7900HT y se midió la fluorescencia (excitación a 490 nm, emisión a 530 nm). Véase la figura 27A. El FabB-645dsFv (3xG4S) es una molécula térmicamente estable con una T_m en exceso de 70 °C.
- 15 Para medir la estabilidad térmica a lo largo de un intervalo de pH, el FabB-645dsFv (3xG4S) a 10 mg/ml se diluyó hasta 0,11 mg/ml con tampones a pH 2,2-8,0 en incrementos de 0,2. Los tampones de pH se prepararon mezclando ácido cítrico 0,1 M y bifosfato de sodio 0,2 M y añadiendo NaCl para igualar la fuerza iónica. A 45 µl de cada muestra con pH diluido se le añadieron 5 µl de 30x disolución madre de tinte fluorescente naranja Sypro. Se analizaron partes alícuotas de 10 µl de esto último por cuadruplicado en placas de 384 pocillos. La placa se calienta desde 20-99 °C usando un sistema de PCR a tiempo real rápido 7900HT y se midió la fluorescencia (excitación a 490 nm, emisión a 530 nm). La T_m después se representó gráficamente frente al pH. Véase la figura 27B. Ambos dominios gA26Fab y 645dsFv del of FabB-645dsFv (3xG4S) tienen unas T_m que casi no se ven afectadas por el pH en el intervalo de pH 4,5-8,0. Por debajo de pH 4,5, la T_m de ambos dominios disminuye hasta que, a pH 4,0, los dos acontecimientos distintos de desplegamiento no pueden distinguirse, y este único acontecimiento tiene una T_m de 65 °C. La T_m de este único acontecimiento de desplegamiento indistinguible continúa disminuyendo a medida que desciende el pH, pero sigue estando por encima de 50 °C a pH 2,2.

Eficacia in vitro del FabB-645dsFv (3xG4S)

- Se evaluó la eficacia *in vitro* de FabB-645dsFv (3xG4S) mediante un ensayo de bloqueo del ligando OX40 basado en células. Brevemente, se aislaron PBMC humanas y se activaron mediante una incubación con PHA-L (fitohemaglutinina-L) 5 µg/ml durante 24-72 horas a 37 °C/5% de CO₂. Las células después se lavaron en PBS/azida de sodio al 0,09% y se cultivaron en placa a 0,25 x 10⁶ células/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos. Se prepararon diluciones de FabB-645dsFv (3xG4S) en PBS/HSA al 5%. También se preparó una disolución de proteína de fusión de CD252-CD8 biotinilada 4 µg/ml en PBS/HSA al 5%. Se añadieron 50 µl de cada dilución de FabB-645dsFv (3xG4S) a 50 µl de la proteína de fusión de CD252-CD8, y la mezcla se incubó con las células T activadas durante 30 minutos a 4 °C. Después de esta incubación, las células se lavaron en PBS/azida de sodio al 0,09%. Las células T activadas después se incubaron con 100 µl de estreptavidina-PE en PBS durante 30 minutos a 4 °C. Las células de nuevo se lavaron en PBS/azida de sodio al 0,09% y después se resuspendieron en tampón y se analizaron mediante citometría de flujo. Se demostró que FabB-645dsFv (3xG4S) bloquea la unión del ligando OX40 a OX40 expresada sobre la superficie de PBMC humanas con una CE50 de aproximadamente 3,5 nM. Véase la figura 28.

Eficacia in vivo del FabB-645dsFv (3xG4S)

- Para estudiar la relación de respuesta a la dosis *in vivo*, se realizó un estudio con el FabB-645dsFv (3xG4S). Brevemente, esto implicó una dosificación en estado constante a 0,3, 3 y 30 µg/ml en ratones HuSCID con una lectura de prevención del injerto de células T.
- 45 Se dosificaron ratones CB17 SCID con una dosis de carga por vía subcutánea en el día -2 de 2,475 mg/kg o 0,2475 mg/kg o 0,02475 mg/kg de FabB-645dsFv (3xG4S) o PBS. En cada día siguiente y hasta el día 14 inclusive, fueron dosificados con una dosis de mantenimiento por vía subcutánea de 0,75 mg/kg o 0,075 mg/kg o 0,0075 mg/kg de FabB-645dsFv (3xG4S) o PBS. Cada grupo de dosificación consistió en 9-10 ratones. En el día -1, todos los ratones fueron tratados con 0,87 mg/ratón de anticuerpo anti-TM-β1 murino de rata para abrogar la actividad de las células asesinas naturales. En el día 0, todos los ratones recibieron una inyección interperitoneal de 8 x 10⁶ células mononucleares de sangre periférica humanas. En el día 14, los ratones fueron sacrificados y se tomó la sangre, el bazo y un lavado peritoneal. Las muestras se analizaron mediante FACS para las células T CD4+ y CD8+. Los conjuntos de datos fueron analizados mediante un Anova de una vía con comparación postensayo de Dunnett. Véanse las figuras 29A, B y C. Las dosificaciones de 30 y 3 µg/ml fueron igualmente eficaces en todos los compartimentos, mientras que la dosificación de 0,3 µg/ml fue estadísticamente eficaz en la sangre y el bazo, pero no al nivel máximo producido por la dosificación de 30 y 3 µg/ml.

Datos comparativos E22: Construcción, expresión y unión al antígeno de 645Fv-652Fab

Construcción de los plásmidos 645Fv-652Fab

5 La síntesis de genes totales de 645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S), 645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP), 645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S), 645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP) fue realizada por un contratista intermediario (DNA2.0). Véanse las figuras 30A, B, C y D para la secuencia de aminoácidos de los 645Fv-652Fab. Todos los genes se clonaron en un vector de expresión de mamífero patentado de UCB bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia de poliA de SV40E.

Expresión en mamíferos de 645Fv-652Fab

10 Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de cadena pesada y ligera usando el reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 2 µg del plásmido de cadena pesada y 2 µg del plásmido de cadena ligera con 10 µl de 293fectin y 340 µl de medio Optimem durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla después se añadió a 5 x10⁶ células HEK293 en suspensión y se incubó durante 4 días con agitación a 37 °C. Después de 4 días, el sobrenadante se recogió mediante centrifugación a 1500 x g para eliminar las células y después se esterilizó mediante filtración a 0,22 µm.

15 Cuantificación de 645Fv-652Fab

20 La concentración del Fv-Fab en los sobrenadantes de mamífero se midió usando un ELISA de "sandwich". El Fv-Fab en la muestra se capturó con un anticuerpo anti-CH1 y se detectó con un conjugado de anti-kappa-HRP. El anticuerpo de detección se reveló con TMB y se calculó la concentración de las muestras desconocidas a partir de una curva patrón. Todos los 645Fv-652Fab tenían unos niveles de expresión similares, pero las versiones de Fv estabilizadas con disulfuro fueron expresadas a 55%-75% del nivel de las versiones no estabilizadas con disulfuro. Véase la figura 31.

Unión al antígeno de 645Fv-652Fab

Método de Biacore

25 Se determinaron las constantes cinéticas y las respuestas de unión para las interacciones de las construcciones de Fv-Fab mediante una resonancia de plasmón de superficie (SPR) realizada en un Biacore 3000 usando chips detectores CM5. El tampón de ensayo, HBS-EP, consistió en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensoactivo P20 al 0,05% en v/v a pH 7,4. Las muestras fueron capturadas sobre la superficie del chip detector usando un anticuerpo monoclonal anti-CH1 humano generado en el laboratorio de los inventores. La inmovilización covalente del anticuerpo de captura se logró mediante la química de acoplamiento de aminas convencional.

30 Un ciclo de ensayo consistió en la captura de la construcción de Fv-Fab durante 1 min, seguido de una fase de asociación (3 min para HSA o 6 min para hIL13), tras lo cual la disociación se controló durante 5 min (HSA) o 20 min (hIL13). Después de cada ciclo, la superficie de captura se regeneró con 2 x inyecciones de 1 min de HCl 40 mM, seguido de 30 s de NaOH 5 mM. Los caudales usados fueron de 10 µl/min para la captura, 30 µl/min para las fases de asociación y disociación, y 10 µl/min para la regeneración.

35 Se realizaron ensayos cinéticos mediante la titulación del antígeno (para HSA con diluciones al doble desde 50 nM-0,3125 nM, para hIL13 una única concentración-20nM). Una célula de flujo de blanco e inyecciones de blanco-tampón permitieron establecer una referencia doble para los datos.

Los parámetros cinéticos se determinaron mediante el ajuste global simultáneo de los sensogramas resultantes a un modelo de unión 1:1 patrón usando el programa informático de evaluación Biacore 3000, 4.1.

40 Para ensayar la unión simultánea, se realizaron inyecciones de 6 min por separado de HSA 50 nM o hIL13 20 nM, o una disolución mixta de HSA 50 nM o hIL13 20 nM, sobre el FvFab capturado.

Experimentos de afinidad de Biacore

45 Se realizaron análisis cinéticos para evaluar la afinidad de las interacciones de HSA y hIL13 con 645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S), 645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP), 645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S) y 645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP). Véanse las figuras 30A y 30B. Todos los Fv-Fab se unieron a HSA con un nivel de unión y afinidad equivalentes. 645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S) y 645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S) se unieron a hIL13 con una afinidad de aproximadamente 0,1 nM, mientras que 645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP) y 645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP) se unieron con una afinidad de aproximadamente 0,6 nM. La diferencia en la afinidad de hIL13 por los Fv-Fab con el conector 3xG4S, comparado con el conector TVAAP/ASTKGP, se produce principalmente en la tasa de asociación. La afinidad de hIL13 y HSA por los Fv-Fab estabilizados con disulfuro y no estabilizados con disulfuro fue equivalente. Los niveles de unión de ML13 a todas las construcciones también fueron equivalentes.

50 Se evaluó la unión simultánea de los Fv-Fab 645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S), 645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-

ASTKGP), 645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S) y 645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP) a ambos HSA y hIL13. Cada construcción de Fv-Fab fue capturada sobre la superficie del chip detector, seguido de distintas inyecciones de 6 min de HSA 50 nM o hIL13 20 nM, o una disolución mixta de ambos HSA 50 nM o hIL13 20 nM. Para cada construcción de Fv-Fab, la respuesta de unión para la disolución de HSA/hIL13 combinada fue equivalente a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes. Véase la figura 32C. Esto demuestra que los Fv-Fab son capaces de una unión simultánea a ambos hIL13 y HSA.

La figura 32C muestra la respuesta de unión ("binding response", RU) observada para cada construcción después de distintas inyecciones de HSA o hIL13, o la inyección de HSA y hIL13 premezclados. En cada caso, la concentración final fue de HSA 50 nM y hIL13 20 nM. La suma de las respuestas individuales de HSA y hIL13 se muestra entre paréntesis.

Listado de secuencias

<110> UCB Pharma SA
 <120> Anticuerpos multivalentes estabilizados con disulfuro
 <130> G0103_WO01
 15 <160> 229
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 1
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 1 5
 25 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Ligante
 <400> 2
 Asp Lys Thr His Thr Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 3
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 40 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Ligante
 <400> 4
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10
 50 <210> 5
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <400> 5
 10 Ala Ala Ala Gly Ser Gly xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Ligante
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 20 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <400> 6
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Ligante
 <400> 7
 Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
 20 25
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Ligante
 <400> 8
 Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 45 <400> 9
 Ala Thr Thr Thr Gly Ser
 1 5
 <210> 10
 <211> 21

ES 2 736 649 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 5 <400> 10
 Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu
 1 5 10 15

 Ser His Lys Ser Pro
 20
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 11
 Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 15 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Ligante
 <400> 12
 Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 13
 Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 30 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Ligante
 <400> 14
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 40 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 45 <400> 15
 Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 736 649 T3

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Ligante
 <400> 16
 Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 17
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 15 <400> 17
 Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 18
 Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val
 1 5 10 15
 Arg Pro
 25 <210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Ligante
 <400> 19
 Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu
 1 5 10 15
 Thr Thr
 <210> 20
 <211> 18
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 20
 Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 40 Phe Asn
 <210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 736 649 T3

<220>

<223> Ligante

<400> 21

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

Pro Ala

-

5 <210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Ligante

<400> 22

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

Arg Thr

<210> 23

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ligante

<400> 23

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

20 Phe Gly

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Ligante

<400> 24

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

Gly Ala

30 <210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ligante

35 <400> 25

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

Asp Leu

40 <210> 26

<211> 18

ES 2 736 649 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 5 <400> 26
 Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro
 1 5 10 15

 Ser Leu
 <210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 27
 Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg
 1 5 10 15

 Ile Ser
 15 <210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Ligante
 <400> 28
 Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg
 1 5 10 15

 Pro
 <210> 29
 <211> 18
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 29
 Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe
 1 5 10 15

 30 Pro Pro
 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Ligante
 <400> 30
 Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
 1 5 10 15

 Pro Tyr
 <210> 31
 40 <211> 17

ES 2 736 649 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 5 <400> 31
 Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
 1 5 10 15

 Pro
 <210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 32
 Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn
 1 5 10 15

 Leu Arg
 15 <210> 33
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Ligante
 <400> 33
 Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr
 1 5 10 15

 Phe Pro
 <210> 34
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <400> 34
 Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
 30 1 5 10
 <210> 35
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Ligante
 <400> 35
 Pro Pro Pro Pro
 1
 <210> 36
 40 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Bisagra

ES 2 736 649 T3

<400> 36
 Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligante

<400> 37
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10

10 <210> 38
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Bisagra

<400> 38
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15

Pro Ala

20 <210> 39
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ligante

25 <400> 39
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 20 25

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

<220>
 <223> Bisagra

<400> 40
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
 1 5 10 15

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

35 <210> 41
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Bisagra

<400> 41
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
 1 5 10 15

ES 2 736 649 T3

```

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

<210> 42
<211> 15
5 <212> PRT
   <213> Artificial

<220>
<223> Ligante

<400> 42
Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
10 1      5      10      15

<210> 43
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial
15

<220>
<223> Ligante

<400> 43
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
1 1      5      10      15

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

<210> 44
<211> 11
20 <212> PRT
   <213> Artificial

<220>
<223> Ligante

25 <400> 44
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala
1 1      5      10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Ligante

<400> 45
Ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser
1 1      5      10

35 <210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> Ligante

<400> 46
Ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly ser
1 1      5      10      15

<210> 47
<211> 21
45 <212> PRT
   <213> Artificial

```

<220>
 <223> Ligante
 <400> 47
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Ser
 20
 5 <210> 48
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Ligante
 <400> 48
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly ser Gly 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
 <210> 49
 <211> 21
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 <220>
 20 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <400> 49
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly xaa Gly Gly Gly Ser xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala ser Ala Ser
 20
 <210> 50
 30 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <220>
 40 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <220>
 <221> característica_misc

ES 2 736 649 T3

<222> (17)..(17)

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

<400> 50

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

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

5 <210> 51
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Ligante

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

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>
 20 <221> característica_misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<400> 51
 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

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

<210> 52
 30 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo dominio H1

ES 2 736 649 T3

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo dominio L1

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54

<211> 120

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo dominio H2

ES 2 736 649 T3

<400> 54

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

<210> 55

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo dominio L2

<400> 55

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Arg
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Anticuerpo dominio H1 CDR-H1

ES 2 736 649 T3

<400> 56
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo dominio H1 CDR-H2
 <400> 57
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 10 1 5 10 15
 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Anticuerpo dominio H1 CDR-H3
 <400> 58
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo dominio L1 CDR-L1
 25 <400> 59
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo dominio L1 CDRL2
 <400> 60
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 35 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Anticuerpo dominio L1 CDR-L3
 <400> 61
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 <210> 62
 <211> 10
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo dominio H2 CDR-H1

ES 2 736 649 T3

<400> 62
 Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ala Met Thr
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo dominio H2 CDR-H2
 <400> 63
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 10 1 5 10 15
 <210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Anticuerpo dominio H2 CDR-H3
 <400> 64
 Gly Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Anticuerpo dominio L2 CDR-L1
 <400> 65
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Arg Leu Ala
 1 5 10
 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Anticuerpo dominio L2 CDR-L2
 <400> 66
 Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser
 1 5
 35 <210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Anticuerpo dominio L2 CDR-L3
 <400> 67
 Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 68
 <211> 232
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fab B-dAbH1 (CH1-G4S4)

ES 2 736 649 T3

<400> 68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn
 130 135 140
 Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 145 150 155 160
 Ile Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala
 165 170 175
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln
 180 185 190
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 195 200 205
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

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

- <220>
- 10 <223> FabB-dAbH2 (CH1-G4Sx2)

ES 2 736 649 T3

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230

- 5 <210> 70
- <211> 223
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> FabB dAbl1 (cCH1-G45x2)

ES 2 736 649 T3

<400> 70

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <220>
- 10 <223> FabB dAbl2 (CH1-G4Sx2)

ES 2 736 649 T3

<400> 71

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

<210> 72

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FabB dABL1 (CK1 G4sx2)

ES 2 736 649 T3

<400> 72

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
 130 135 140
 Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 180 185 190
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly
 195 200 205
 Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 210 215 220
 Glu Ile Lys
 225

- 5 <210> 73
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> FabB dAbl2 (CK1 G4Sx2)

ES 2 736 649 T3

<400> 73

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

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

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

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

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys

225

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

<220>

- 10 <223> cadena pesada Fab'A

ES 2 736 649 T3

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <220>
- 10 <223> cadena ligera FabA

ES 2 736 649 T3

<400> 75

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 50 55 60
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 Lys Met Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Val Gln
 165 170 175
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

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

<220>

- 10 <223> cadena pesada Fab'A (ligante modificado)

ES 2 736 649 T3

<400> 76

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu
 65 70 75 80
 Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 85 90 95
 Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe
 115 120 125
 Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Thr Cys Asp Lys Thr His Thr Ser
 245 250

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

<220>

10 <223> cadena pesada FabA

ES 2 736 649 T3

<400> 77

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu
 65 70 75 80
 Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 85 90 95
 Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe
 115 120 125
 Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Thr Cys

- 5 <210> 78
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> mdAbH1

ES 2 736 649 T3

<400> 78

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

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

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro 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 Ser Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Phe Leu Lys Met
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mdAbL1

<400> 79

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

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

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

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

Ala Glu Asp Leu 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 Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 80

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mdAbH2

5

10

15

ES 2 736 649 T3

<400> 80

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly 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 Ser Ile Ser Lys Asp Ser Thr Gln Val Phe Leu Lys Met
 65 70 75 80
 Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met 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

5 <210> 81
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> mdAbL2

<400> 81
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu 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 Thr Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe 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 Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

15 <210> 82
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mFabD-mdidAb dAbH1(CH1-G4sx2)

ES 2 736 649 T3

<400> 82

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

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

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

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

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

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

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
130 135 140

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

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

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

Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr
195 200 205

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
225 230 235

- 5 <210> 83
- <211> 237
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> mFabD-mdidAb, -dAbL1(CK-G4sx2)

<400> 83

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

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

ES 2 736 649 T3

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 115 120 125
 Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Gln Ser Ser Pro Ser
 130 135 140
 Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 145 150 155 160
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro
 165 170 175
 Asp Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 180 185 190
 Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly
 195 200 205
 Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 210 215 220
 Ile Lys Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 225 230 235

<210> 84
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mFabD-mdidAb, -dAbH2(CH1-G4sx2)

<400> 84
 Ala Lys Thr Thr pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15

10

ES 2 736 649 T3

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60
 Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 115 120 125
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 130 135 140
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 145 150 155 160
 Gly Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 165 170 175
 Gly Arg Phe Ser Ile Ser Lys Asp Ser Thr Gln Val Phe Leu Lys Met
 180 185 190
 Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
 195 200 205
 Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 225 230 235 240

<210> 85
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mFabD-mdidAb, -dAbL2(CK-G4Sx2)

<400> 85
 Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15

5

10

ES 2 736 649 T3

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 115 120 125
 Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser
 130 135 140
 Ile Gly Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro
 145 150 155 160
 Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro Ser
 165 170 175
 Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp
 195 200 205
 Tyr Ser Ser Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 210 215 220
 Ile Lys Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 225 230 235

<210> 86

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dAbH1(CH1-G4Sx2)mFabC-mdAbH1

5

ES 2 736 649 T3

<400> 86

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

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

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

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

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

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

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
130 135 140

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

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

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

Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr
195 200 205

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
225 230 235

<210> 87

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mFabC-mdidAb, -dAbL1(CK-G4Sx2)

5

ES 2 736 649 T3

<400> 87

Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 115 120 125
 Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Gln Ser Ser Pro Ser
 130 135 140
 Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 145 150 155 160
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro
 165 170 175
 Asp Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 180 185 190
 Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly
 195 200 205
 Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 210 215 220
 Ile Lys Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 225 230 235

<210> 88

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mFabC-mdidAb dAbH2(CH1-G4Sx2)

5

ES 2 736 649 T3

<400> 88

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60
 Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 115 120 125
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 130 135 140
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 145 150 155 160
 Gly Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 165 170 175
 Gly Arg Phe Ser Ile Ser Lys Asp Ser Thr Gln Val Phe Leu Lys Met
 180 185 190
 Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
 195 200 205
 Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 225 230 235 240

<210> 89

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mFabC-mdidAb, -dAbL2(CK-G4Sx2)

5

ES 2 736 649 T3

<400> 89
 Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 115 120 125
 Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser
 130 135 140
 Ile Gly Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro
 145 150 155 160
 Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro Ser
 165 170 175
 Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp
 195 200 205
 Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 210 215 220
 Ile Lys Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 225 230 235

<210> 90
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 646Fv CDRH3

<400> 90
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 736 649 T3

<220>
 <223> 646Fv CDRL1
 <400> 91
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asp Phe Leu Ser
 1 5 10
 5 <210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> 646Fv CDRL2
 <400> 92
 Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 93
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 646Fv CDRL3
 <400> 93
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 20 1 5 10
 <210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> 647FV CDRH1
 <400> 94
 Gly Phe Thr Leu Ser Asn Asn Tyr Trp Met Cys
 1 5 10
 30 <210> 95
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 647FV CDRH2
 35 <400> 95
 Cys Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Asp Thr Ala Tyr Thr Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 96
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> 647Fv CDRH3
 <400> 96
 Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Val Phe Ile Leu
 1 5 10
 45 <210> 97
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 736 649 T3

<220>
 <223> 647Fv QASQSLGNRLA
 <400> 97
 Gln Ala Ser Gln Ser Leu Gly Asn Arg Leu Ala
 1 5 10
 5 <210> 98
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> 647Fv CDRL2
 <400> 98
 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 99
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 647Fv CDRL3
 <400> 99
 Gln Cys Thr Tyr Ile Gly Ser Lys Met Gly Ala
 20 1 5 10
 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> 649Fv CDRH1
 <400> 100
 Gly Phe Ser Phe Ser Gly Asn Tyr Trp Ile Cys
 1 5 10
 30 <210> 101
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 649Fv CDRH2
 35 <400> 101
 Cys Ile Phe Thr Ala Asp Gly Asp Thr Ala Tyr Thr Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 102
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> 649Fv CDRH3
 <400> 102
 Ser Gly Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Val Phe Ile Leu
 1 5 10
 45 <210> 103
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 736 649 T3

<220>
 <223> 649Fv CDRL1
 <400> 103
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Arg Leu Gly
 1 5 10
 5 <210> 104
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> 649Fv CDRL2
 <400> 104
 Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 105
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 649Fv CDRL3
 <400> 105
 Gln Cys Thr Tyr Ile Gly Lys Leu Met Gly Ala
 1 5 10
 20 <210> 106
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> 645Pesadal50AFv CDRH1
 <400> 106
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 30 <210> 107
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50AFv CDRH2
 35 <400> 107
 Ala Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 108
 <211> 13
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50AFv CDRH3
 <400> 108
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> 645Pesadal50AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 109
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 110
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaI50AFv CDRL2
 <400> 110
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 <210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaI50AFV CDRL3
 <400> 111
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 <210> 112
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56AFv CDRH1
 25 <400> 112
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56AFv CDRH2
 <400> 113
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 114
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaT56AFv CDRL2
 <400> 114
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 115
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56AFv CDRL1

<400> 115
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 116
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56AFv CDRL2
 <400> 116
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 117
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaT56AFv CDRL3
 <400> 117
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 118
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT95AFv CDRH1
 25 <400> 118
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 119
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT95AFv CDRH2
 <400> 119
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 120
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaT95AFv CDRH3
 <400> 120
 Ala Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 121
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT95AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 121
 Glu Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 122
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT95AFv CDRL2
 <400> 122
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaT95AFv CDRL3
 <400> 123
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadav96AFv CDRH1
 25 <400> 124
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 125
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadav96AFv CDRH2
 <400> 125
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 126
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645Pesadav96AFv CDRH3
 <400> 126
 Thr Ala Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 127
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadav96AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 127
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 128
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaV96AFv CDRL2
 <400> 128
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 129
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaV96AFv CDRL3
 <400> 129
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP97AFv CDRH1
 25 <400> 130
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 131
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP97AFv CDRH2
 <400> 131
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 132
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaP97AFv CDRH3
 <400> 132
 Thr Val Ala Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 133
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP97AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 133
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 134
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP97AFv CDRL2
 <400> 134
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaP97AFv CDRL3
 <400> 135
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 136
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaG98AFv CDRH1
 25 <400> 136
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 137
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaG98AFv CDRH2
 <400> 137
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 138
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaG98AFv CDRH3
 <400> 138
 Thr Val Pro Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 139
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaG98AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 139
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 140
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaG98AFv CDRL2
 <400> 140
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 141
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaG98AFv CDRL3
 <400> 141
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 142
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaY99AFv CDRH1
 25 <400> 142
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 143
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaY99AFv CDRH2
 <400> 143
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 144
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaY99AFv CDRH3
 <400> 144
 Thr Val Pro Gly Ala Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaY99AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 145
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 146
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaY99AFv CDRL2
 <400> 146
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaY99AFv CDRL3
 <400> 147
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 148
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaS100AFv CDRH1
 25 <400> 148
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 149
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaS100AFv CDRH2
 <400> 149
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 150
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaS100AFv CDRH3
 <400> 150
 Thr Val Pro Gly Tyr Ala Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 151
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaS100AFv CDRL1

<400> 151
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 152
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaS100AFv CDRL2
 <400> 152
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 153
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaS100AFv CDRL3
 <400> 153
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 154
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT100aAFv CDRH1
 25 <400> 154
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 155
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT100aAFv CDRH2
 <400> 155
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 156
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaT100aAFv CDRH3
 <400> 156
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Ala Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 157
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT100aAFv CDRL1

<400> 157
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 158
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT100aAFv CDRL2
 <400> 158
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 159
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaT100aAFv CDRL3
 <400> 159
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 160
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP100cAFv CDRH1
 25 <400> 160
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 161
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP100cAFv CDRH2
 <400> 161
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 162
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaP100cAFv CDRH3
 <400> 162
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Ala Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 163
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP100cAFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 163
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 164
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaP100cAFv CDRL2
 <400> 164
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 165
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaP100cAFv CDRL3
 <400> 165
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 166
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaI50A+T95AFv CDRH1
 25 <400> 166
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 167
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaI50A+T95AFv CDRH2
 <400> 167
 Ala Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 168
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaI50A+T95AFv CDRH3
 <400> 168
 Ala Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 169
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaI50A+T95AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 169
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 170
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+T95AFv CDRL2
 <400> 170
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645Pesadal50A+T95AFv CDRL3
 <400> 171
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 172
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+G98AFv CDRH1
 25 <400> 172
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 173
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+G98AFv CDRH2
 <400> 173
 Ala Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 174
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645Pesadal50A+G98AFv CDRH3
 <400> 174
 Thr Val Pro Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 175
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+G98AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 175
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 176
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+G98AFv CDRL2
 <400> 176
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 177
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645Pesadal50A+G98AFv CDRL3
 <400> 177
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 178
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+Y99AFv CDRH1
 25 <400> 178
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 179
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+Y99AFv CDRH2
 <400> 179
 Ala Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 180
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645Pesadal50A+Y99AFv CDRH3
 <400> 180
 Thr Val Pro Gly Ala Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 181
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645Pesadal50A+Y99AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 181
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10 --

<210> 182
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaI50A+Y99AFv CDRL2

<400> 182
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5

10 <210> 183
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> 645PesadaI50A+Y99AFv CDRL3

<400> 183
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10

20 <210> 184
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+T95AFv CDRH1

25 <400> 184
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10

<210> 185
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+T95AFv CDRH2

<400> 185
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

35 <210> 186
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaT56A+T95AFv CDRH3

<400> 186
 Ala Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 187
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+T95AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 187
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 188
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+T95AFv CDRL2
 <400> 188
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 189
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaT56A+T95AFv CDRL3
 <400> 189
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+G98AFv CDRH1
 25 <400> 190
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 191
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+G98AFv CDRH2
 <400> 191
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 192
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaT56A+G98AFv CDRH3
 <400> 192
 Thr Val Pro Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 193
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+G98AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 193
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 194
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+G98AFv CDRL2
 <400> 194
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 195
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaT56A+G98AFv CDRL3
 <400> 195
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 196
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+Y99AFv CDRH1
 25 <400> 196
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 1 5 10
 <210> 197
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+Y99AFv CDRH2
 <400> 197
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 35 <210> 198
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> 645PesadaT56A+Y99AFv CDRH3
 <400> 198
 Thr Val Pro Gly Ala Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 199
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+Y99AFv CDRL1

ES 2 736 649 T3

<400> 199
 Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 200
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645PesadaT56A+Y99AFv CDRL2
 <400> 200
 Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5
 10 <210> 201
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 645PesadaT56A+Y99AFv CDRL3
 <400> 201
 Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 20 <210> 202
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645dsFv Cadena pesada Fv
 25 <400> 202
 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 Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met
 65 70 75 80
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr
 85 90 95
 Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 203
 <211> 110
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> 645dsFv Cadena ligera Fv

ES 2 736 649 T3

<400> 203

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 204
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> 648dsFv Cadena pesada Fv

<400> 204

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

- 15 <210> 205
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- <223> 648dsFv Cadena ligera Fv

ES 2 736 649 T3

<400> 205

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
100 105 110

<210> 206

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de 645Fv

<400> 206

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

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

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

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

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

10

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 207

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de 645Fv

ES 2 736 649 T3

<400> 207

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

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

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

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

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

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

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

<210> 208

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido de unión a albúmina

<400> 208

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

<210> 209

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Péptido de unión a albúmina

<400> 209

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

<210> 210

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido de unión a albúmina

25 <400> 210

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

<210> 211

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido de unión a albúmina

ES 2 736 649 T3

<400> 211
 Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Glu Asp Asp Glu
 20

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

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

<400> 212
 Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

10 Gly Arg ser Val
 20

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

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

<400> 213
 Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

20 Gly Arg Ser Val Lys
 20

<210> 214
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 214
 Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
 1 5 10 15

30 <210> 215
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

35 <400> 215
 Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1 5 10 15

Asp Asp

<210> 216
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> Artificial

ES 2 736 649 T3

<220>
 <223> Péptido de unión a albúmina
 <400> 216
 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
 1 5 10 15
 5 <210> 217
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Péptido de unión a albúmina
 <400> 217
 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
 1 5 10 15
 <210> 218
 <211> 18
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina
 <400> 218
 Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 1 5 10 15
 20 Asp Asp
 <210> 219
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina
 <400> 219
 Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Gly
 20
 30 <210> 220
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina
 35 <400> 220
 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
 <210> 221
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido de unión a albúmina

<400> 221
 Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met
 1 5 10
 <210> 222
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 646FV CDRH1
 <400> 222
 Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn
 10 1 5 10
 <210> 223
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> 646FV CDRH2
 <400> 223
 Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 224
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ligante
 25 <400> 224
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 225
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ligante
 <400> 225
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 35 <210> 226
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> dominio 652 VH
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (26)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (50)..(65)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <220>
 50 <221> característica_misc

ES 2 736 649 T3

<222> (98)..(109)

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

<400> 226

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Gly Xaa
50 55 60

Xaa Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Xaa Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 227
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> dominio 652 VL

- <220>
- <221> característica_misc
- <222> (24)..(34)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

- 15 <220>
- <221> característica_misc

ES 2 736 649 T3

<222> (50)..(56)

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

<220>

<221> característica_misc

5

<222> (89)..(97)

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

<400> 227

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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa 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

10

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser
210 215

<210> 228

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> ligante

<400> 228

Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

20

<210> 229

<211> 5

ES 2 736 649 T3

<212> PRT
<213> Artificial

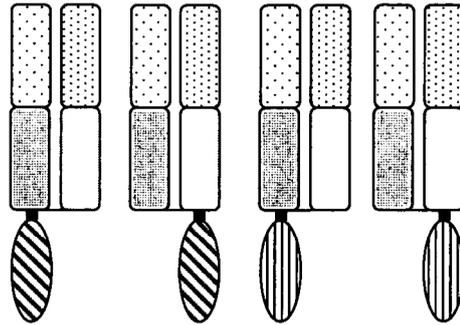
<220>
<223> ligante

5 <400> 229
Thr Val Ala Ala Pro
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente que consiste en un fragmento Fab o Fab', con una primera especificidad por un antígeno de interés, y dos anticuerpos de dominio único (dAb) que son una pareja de VH/VL con especificidad por un segundo antígeno de interés, en la que los dos anticuerpos de dominio único están unidos mediante un enlace disulfuro entre dos restos cisteína, uno en VH y otro en VL, en la que la posición de los dos restos cisteína es VH44 y VL100, según la numeración de Kabat, y en la que el V_H de dAB está conectado directa o indirectamente con el C-terminal de la cadena pesada del Fab o Fab' mediante una fusión genética, y el V_L de dAB está conectado directa o indirectamente con el C-terminal de la cadena ligera del Fab o Fab' mediante una fusión genética.
- 10 2.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según la reivindicación 1, en la que los dos anticuerpos de dominio único son una pareja VH/VL complementaria que se une al segundo antígeno de modo cooperativo.
- 3.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el primer antígeno y el segundo antígeno son entidades diferentes.
- 15 4.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el dominio VH y/o VL está unido al fragmento Fab o Fab' a través de un conector que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO:224 o SEQ ID NO:225.
- 5.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el segundo antígeno es la albúmina.
- 20 6.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el segundo antígeno es la albúmina del suero humana.
- 7.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo de dominio único de VH comprende una CDR que tiene la secuencia que se indica en la figura 5 (e) SEQ ID NO:56 o la figura 5 (k) SEQ ID NO:62 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia que se indica en la figura 5 (f) SEQ ID NO:57 o la figura 5 (l) SEQ ID NO:63 para CDR-H2, y una CDR que tiene la secuencia que se indica en la figura 5 (g) SEQ ID NO:58 o la figura 5 (m) SEQ ID NO:64 para CDR-H3.
- 25 8.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo de dominio único de VL comprende una CDR que tiene la secuencia que se indica en la figura 5 (h) SEQ ID NO:59 o la figura 5 (n) SEQ ID NO:65 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia que se indica en la figura 5 (i) SEQ ID NO:60 o la figura 5 (o) SEQ ID NO:66 para CDR-L2, y una CDR que tiene la secuencia que se indica en la figura 5 (j) SEQ ID NO:61 o la figura 5 (p) SEQ ID NO:67 para CDR-L3.
- 30 9.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según la reivindicación 6, en la que el anticuerpo de dominio único de VH comprende la secuencia que se indica en SEQ ID NO:202, y el anticuerpo de dominio único de VL comprende la secuencia que se indica en SEQ ID NO:203.
- 35 10.- Una proteína de fusión de anticuerpo multivalente según la reivindicación 6, en la que el anticuerpo de dominio único de VH comprende la secuencia que se indica en SEQ ID NO:204, y el anticuerpo de dominio único de VL comprende la secuencia que se indica en SEQ ID NO:205.

Figura 1



dAbL o dAbH están unidos al extremo C-terminal de la región constante de la cadena ligera o pesada a través de un conector (—).

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

Figura 2a

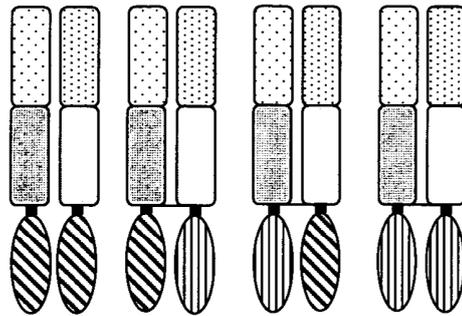
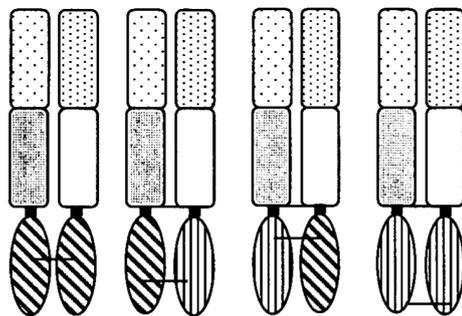


Figura 2b



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

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

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

Enlace disulfuro 

Figura 3

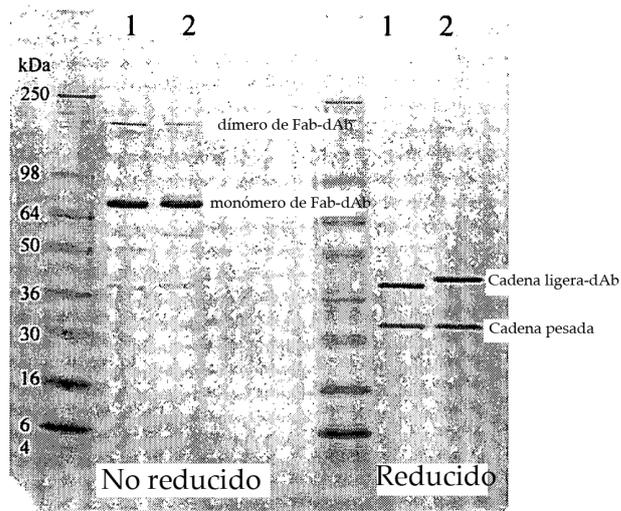


Figura 4

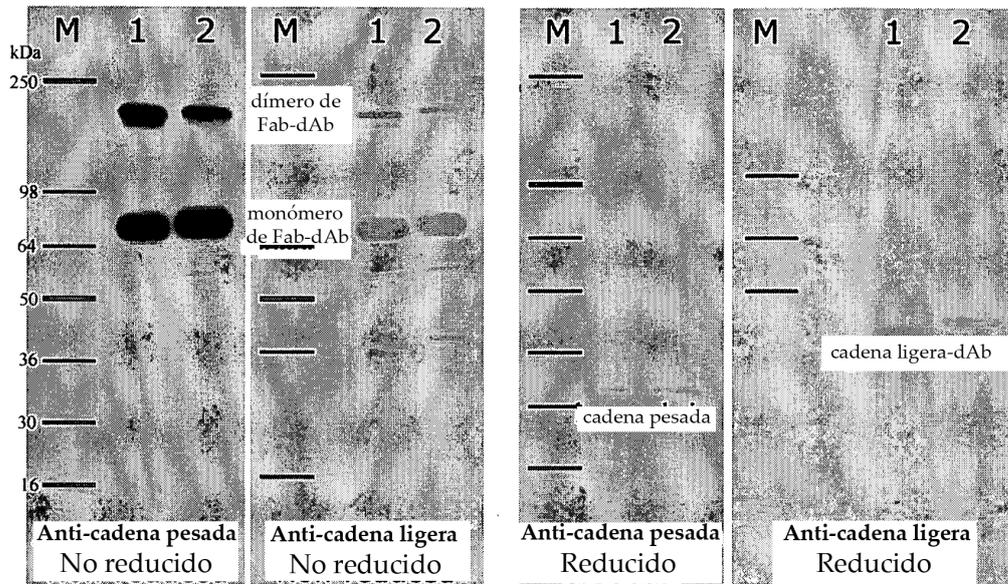


Figura 4a

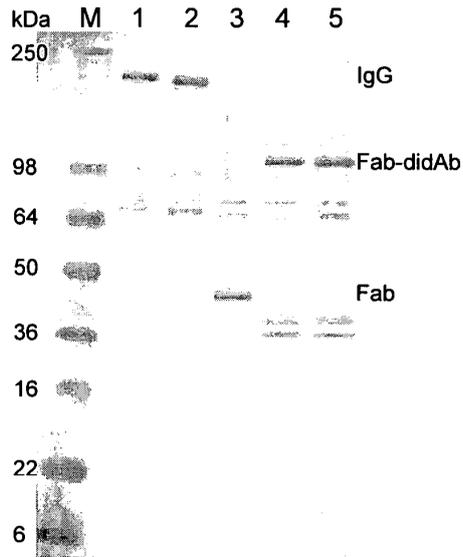


Figura 5

a) dAbH1

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWA
SGTTFYATWAKGRFTISRDTTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPY
FDLWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:52)

b) dAbL1

DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEAS
KLTSGVPSRFK GSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO:53)

c) dAbH2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLRYAMTWVRQAPGKGLEWIGTIT
TGGNTNYANWAKGRFTISKDSTTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARGGYVSYA
DATELSLWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:54)

d) dAbL2

DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSR LAWYQQKPGKAPKLLIYYAST
VASGVPSRFK GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQSYDYSSSSSYAFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO:55)

dAbH1

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

dAbL1

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

dAbH2

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

dAbL2

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

Figura 6

FabB-dAbH1 (CH1-G₄Sx2)

DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA DE FAB-B +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGL
EWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTISRDTTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTV
PGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:68)

FabB-dAbH2 (CH1-G₄Sx2)

DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA DE FAB-B +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGFSLSR YAMTWVRQAPGKG
LEWIGTITGGNTNYANWAKGRFTISKDSTTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAR
GGYVSYADATELSLWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:69)

FabB-dAbL1 (CH1-G₄Sx2)

DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA DE FAB-B +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAP
KLLIYEASKLTSGVPSRFK GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTT
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:70)

FabB-dAbL2 (CH1-G₄Sx2)

DOMINIO VARIABLE DE CADENA PESADA DE FAB-B +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSDIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSRLAWYQQKPGKAPKL
LIYYASTVASGVPSRFK GSGSGTEFTLTISSLQPD DFATYYCQSYDYSSSSSYA
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:71)

FabB-dAbL1 (CK-G₄Sx2)

DOMINIO VARIABLE DE CADENA LIGERA DE FAB-B +

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQK

Figura 6 (continuación)

PGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYS
SISDTTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:72)

FabB-dAbL2 (CK-G₄Sx2)

DOMINIO VARIABLE DE CADENA LIGERA DE FAB-B +

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECGGGGSGGGGSDIVMTQSPSTLSASVGDRTITCQASQSIGSRLAWYQQKP
GKAPKLLIYYASTVASGVPSRFKGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQSYDYS
SSSSYAFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:73)

Figura 7

Cadena pesada de Fab'A

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLST
SGVGVGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTCDKHTCPPCPA (SEQ
ID NO:74)

Cadena ligera de FabA

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISN
YLSWYQQKPKGKAPKLLIYYTSKLSHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT
YYCQQGKMLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNAVQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:75)

Cadena pesada de Fab'A (conector de bisagra modificado)

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLST
SGVGVGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTCDKHTS (SEQ ID
NO:76)

Cadena pesada de FabA

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLST
SGVGVGWVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTC (SEQ ID NO:77)

El texto en negrita de las secuencias de la figura 7 se corresponde con la secuencia señal.

Figura 8a

mdAbH1

QVQLKESGPGLVAPSQLSITCTVSGIDLSNYAINWVRQPPGKGLEWIGIIWAS
GTTFYATWAKGRFSISRSTTVFLKMNSLQTDDTARYYCARTVPGYSTAPYF
DLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:78)

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO:56)
CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO:57)
CDRH3 TVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO:58)

mdAbL1

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGQPPELLIYEAS
KLTSGVPDRFKGSGSGTDFTLTISSVQAEDLATYYCGGGYSSISDITFGGGTK
LEIKR (SEQ ID NO:79)

CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO:59)
CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO:60)
CDRL3 GGGYSSISDIT (SEQ ID NO:61)

mdAbH2

QVQLKESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLSRyamTWVRQPPGKGLEWIGTITT
GGNTNYANWAKGRFSISKDSTQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARGGYVSYAD
ATELSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:80)

CDRH1 GFSLSRyamT (SEQ ID NO:62)
CDRH2 TITGGNTNYANWAKG (SEQ ID NO:63)
CDRH3 GGYVSYADATELSL (SEQ ID NO:64)

mdAbL2

DIVMTQSPSSLSASLGERVTITCQASQSIGSRLAWYQQKPGKTPKLLIFYASTV
ASGVPSRFKSGSGTEFSLTISSLQPEDFATYYCQSYDYSSSSSYAFGGGKLEI
KR (SEQ ID NO:81)

CDRL1 QASQSIGSRLA (SEQ ID NO:65)
CDRL2 YASTVAS (SEQ ID NO:66)
CDRL3 QSYDYSSSSSYA (SEQ ID NO:67)

Figura 8b

mFabD-mdidAb, -dAbL1(CK-G₄Sx2) & -dAbH1(CH1-G₄Sx2)

Dominio variable de cadena pesada +

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT
FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGGG
GSGGGGSQVQLKESGPGLVAPSQLSITCTVSGIDLSNYAINWVRQPPGKGLE
WIGIHWASGTTFYATWAKGRFSISRSTTVFLKMNSLQTDDTARYYCARTVP
GYSTAPYFDLWGQGLVTVSSDYKDDDDK (SEQ ID NO:82)

Dominio variable de cadena ligera +

TDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKWKIDGSERQNGVLN
SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC
GGGGSGGGSDIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCQSSPSVWSNFLSWYQQKPG
QPKLLIYEASKLTSQVDRFKGSGSGTDFTLTISSVQAEDLATYYCGGGYSSI
SDTTFGGGTKLEIKREQKLISEEDL (SEQ ID NO:83)

mFabD-mdidAb, -dAbL2(CK-G₄Sx2) & -dAbH2(CH1-G₄Sx2)

Dominio variable de cadena pesada +

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT
FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGGG
GSGGGGSQVQLKESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLRYAMTWVRQPPGKGL
EWIGTITGGNTNYANWAKGRFSISKDSTQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARG
GYVSYADATELSLWGQGLVTVSSDYKDDDDK (SEQ ID NO:84)

Dominio variable de cadena ligera +

TDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKWKIDGSERQNGVLN
SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC
GGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASLGERVTITCQASQSIGSRLAWYQQKPGKT
PKLLIFYASTVASGVPSRFKSGSGTEFSLTISSLQPEDFATYYCQSYDYSSSSS
YAFGGGTKLEIKREQKLISEEDL (SEQ ID NO:85)

Los extremos C-terminales del dAbL están terminados con un marcador FLAG y los extremos C-terminales del dAbH están terminados con un marcador Myc.

Figura 8c

mFabC-mdidAb, -dAbL1(CK-G₄Sx2) & -dAbH1(CH1-G₄Sx2)mFabC-mdAbH1

Dominio variable de cadena pesada +

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT
 FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGGG
GSGGGGSQVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGIDLSNYAINWVRQPPGKGLE
 WIGIHWASGTTFYATWAKGRFSISRSTTVFLKMNSLQDDTARYYCARTVP
 GYSTAPYFDLWGQGLVTVSSDYKDDDDK (SEQ ID NO:86)

Dominio variable de cadena ligera +

TDAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN
 SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC
GGGGSGGGSDIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCQSSPSVWSNFLSWYQQKPG
 QPKLLIYEASKLTSQVPRFKGSGSGTDFTLTISSVQAEDLATYYCGGGYSSI
 SDTTFGGGTKLEIKREQKLISEEDL (SEQ ID NO:87)

mFabC-mdidAb, -dAbL2(CK-G₄Sx2) & -dAbH2(CH1-G₄Sx2)

Dominio variable de cadena pesada +

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT
 FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGGG
GSGGGGSQVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLRYAMTWVRQPPGKGL
 EWIGTITGGNTNYANWAKGRFSISKDSTQVFLKMNSLQDDTAMYYCARG
 GYVSYADATELSLWGQGLVTVSSDYKDDDDK (SEQ ID NO:88)

Dominio variable de cadena ligera +

TDAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN
 SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC
GGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASLGERVTITCQASQSIGSRLAWYQQKPGKT
 PKLLIFYASTVASGVPSRFKSGSGTDFSLTISSLPEDFATYYCQSYDYSSSSS
 YAFGGGTKLEIKREQKLISEEDL (SEQ ID NO:89)

Figura 9

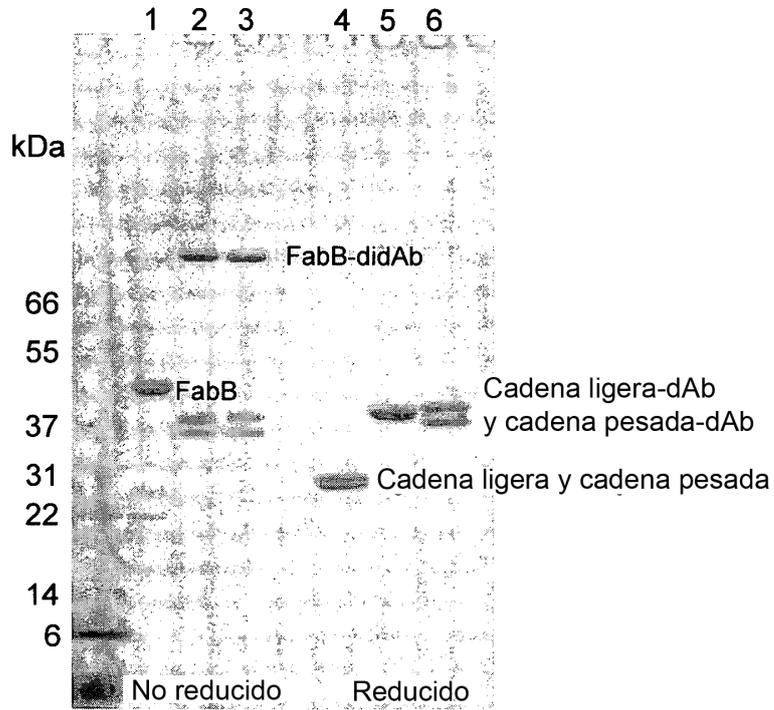


Figura 10

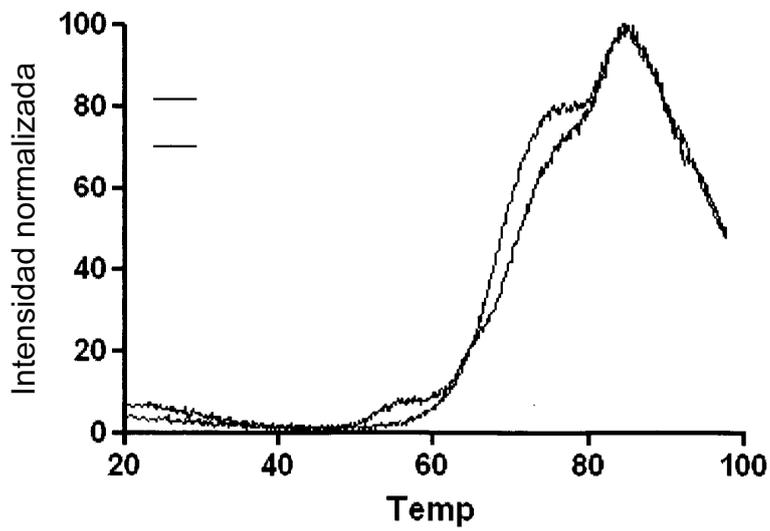


Figura 11

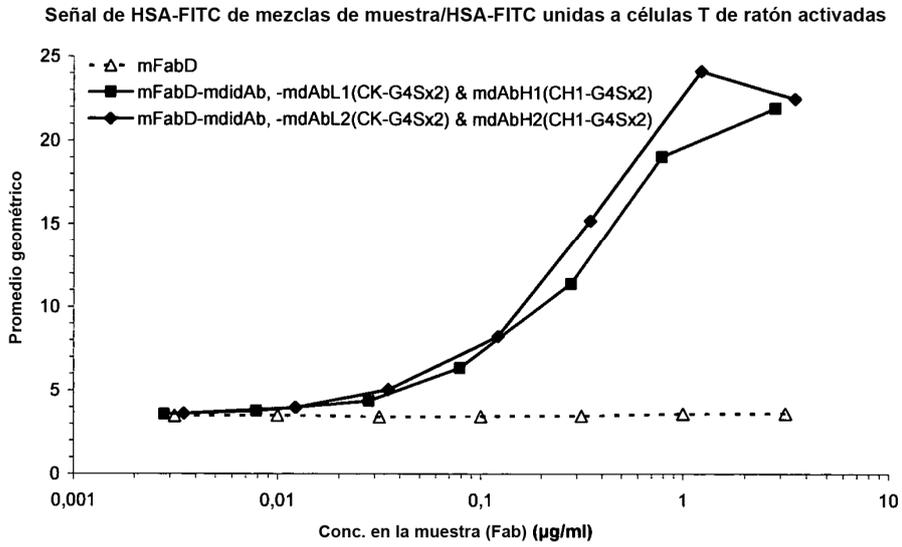


Figura 12

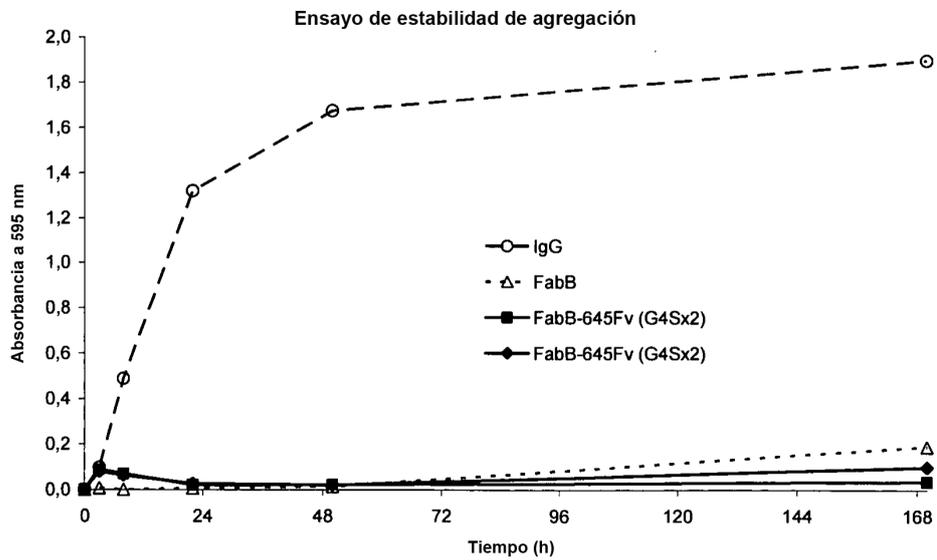


Figura 13

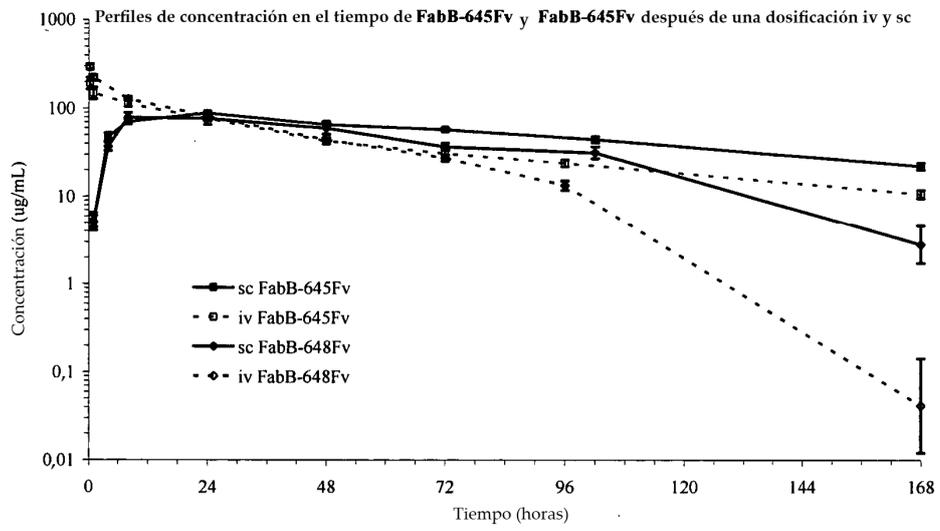
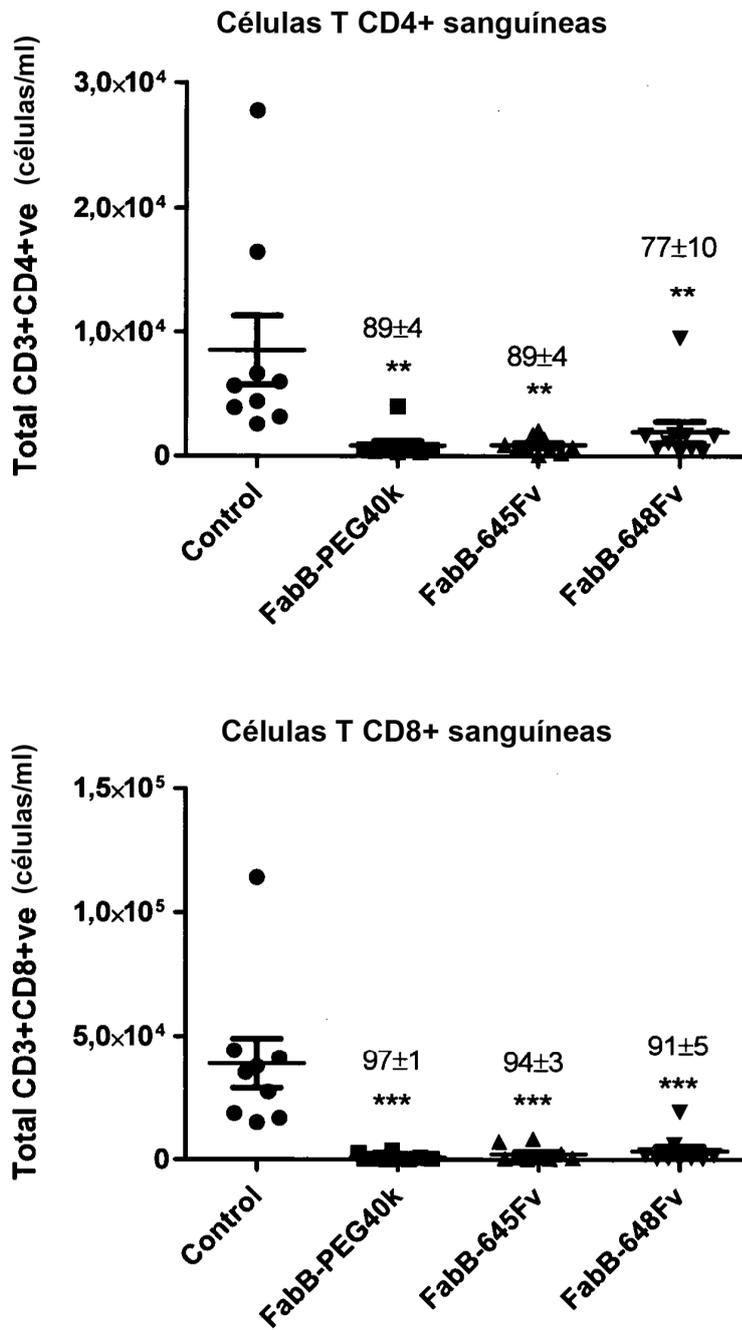
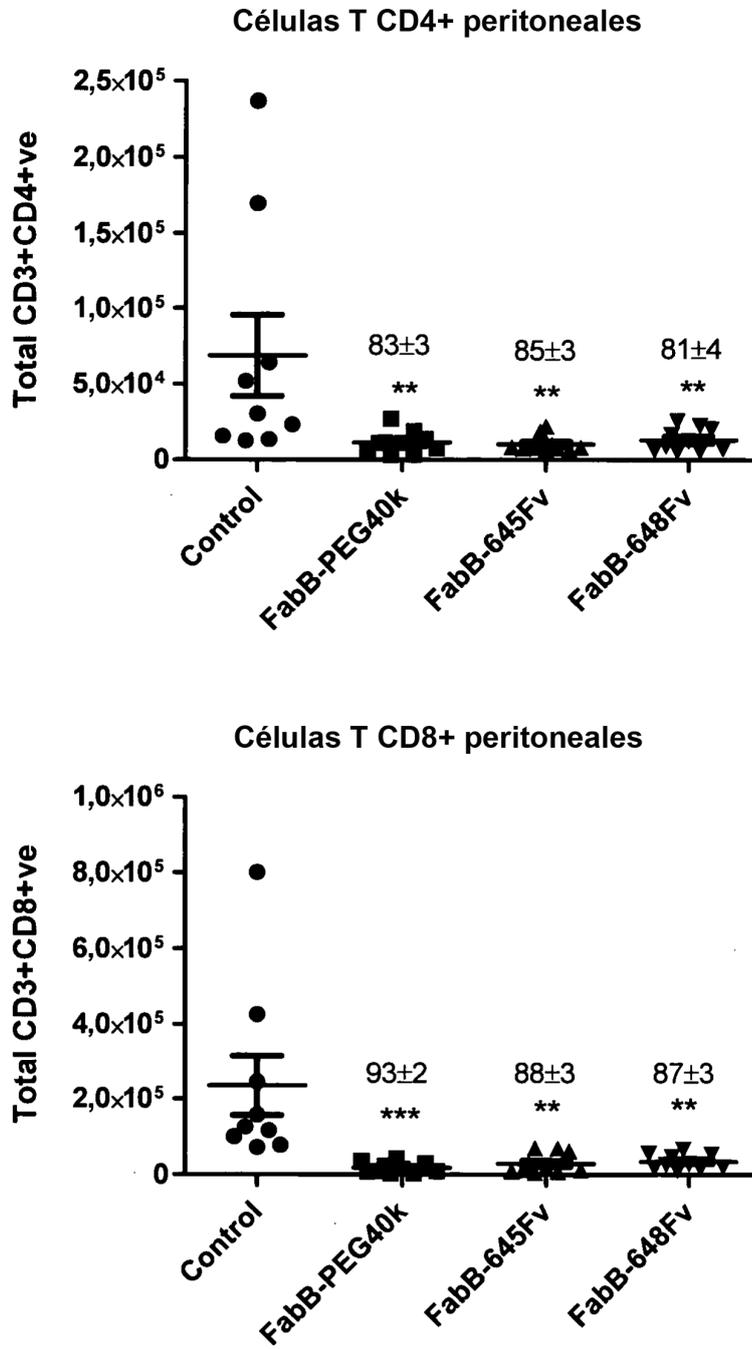


Figura 14A



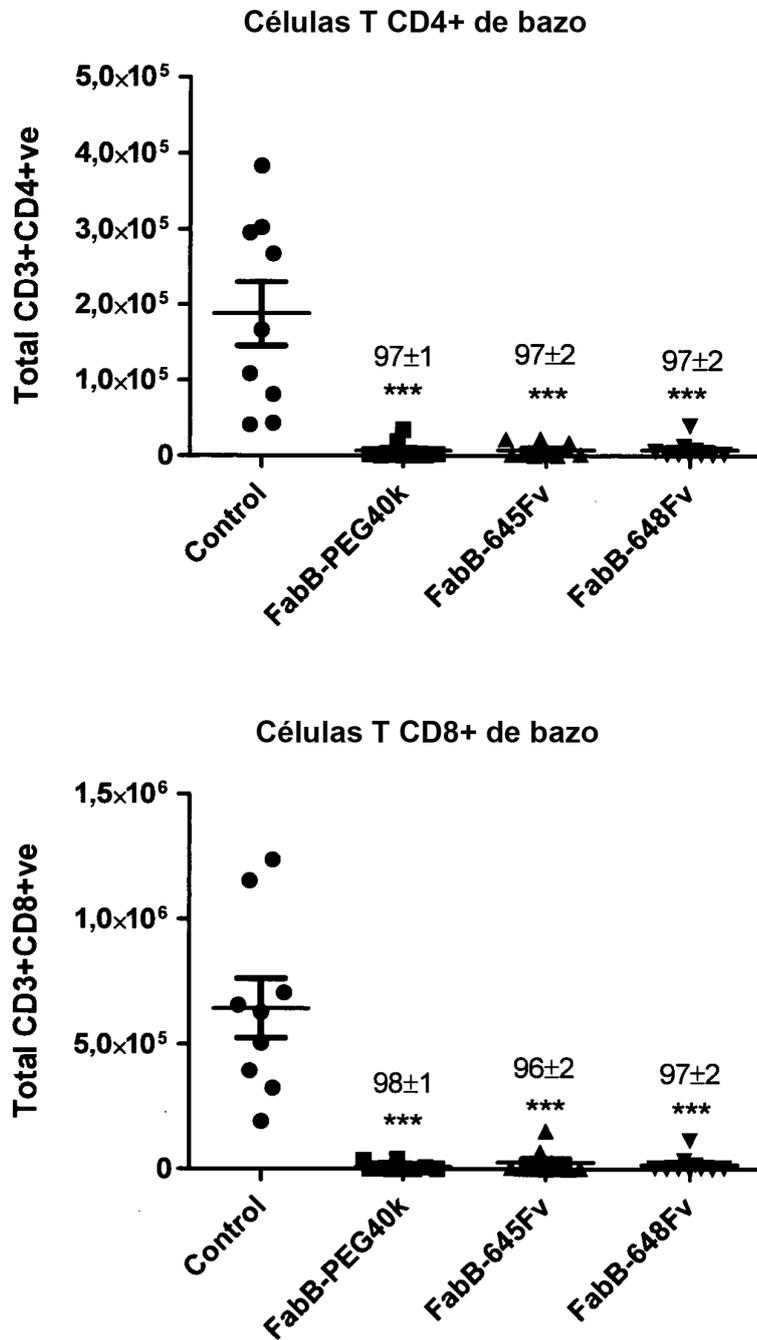
P<0,01, *P<0,001

Figura 14B



P<0,01, *P<0,001

Figura 14C



P<0,01, *P<0,001

Figura 15

Análisis de SDS-PAGE de FabB-645Fv (1-5xG₄S)

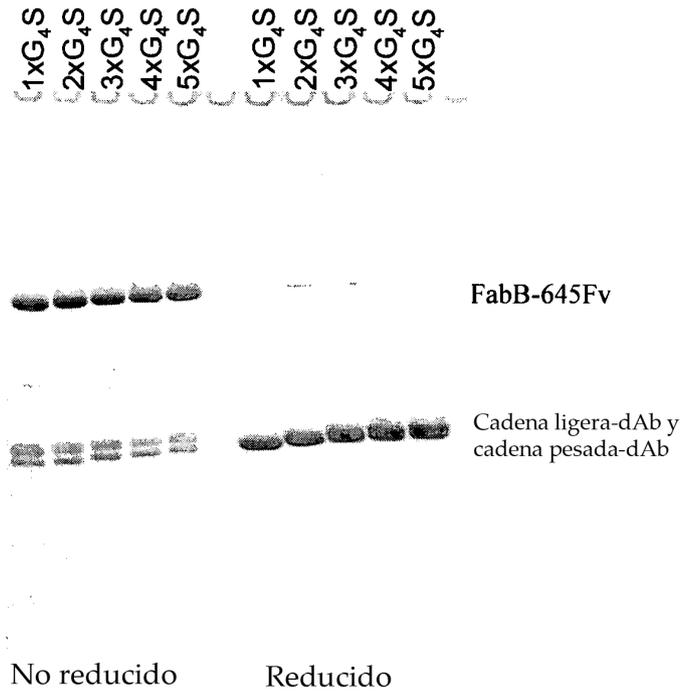


Figura 16

Análisis de exclusión molecular de FabB-645Fv (1-5xG₄S)

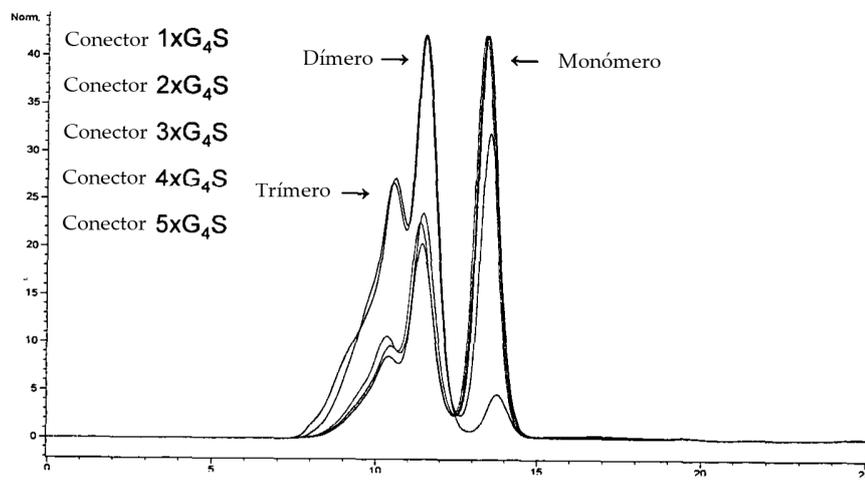


Figura 17

Termogramas de FabB-645Fv (1-5xG₄S)

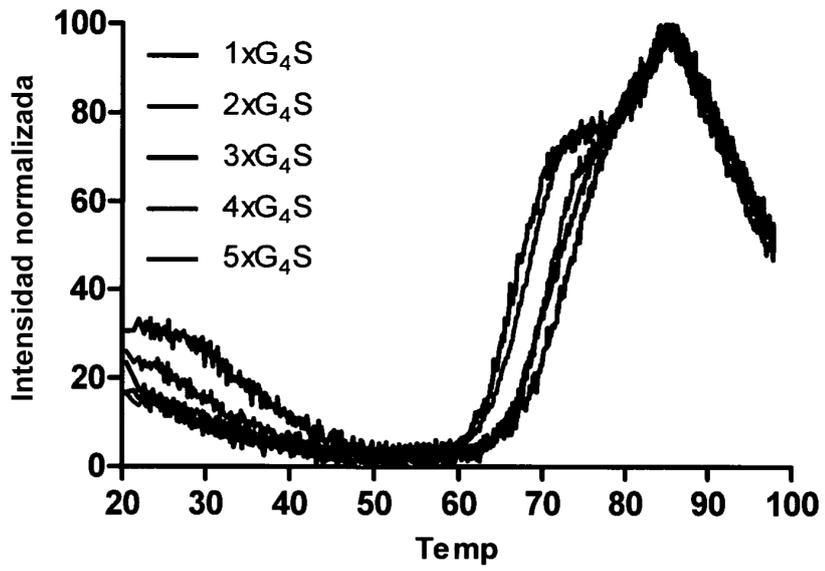
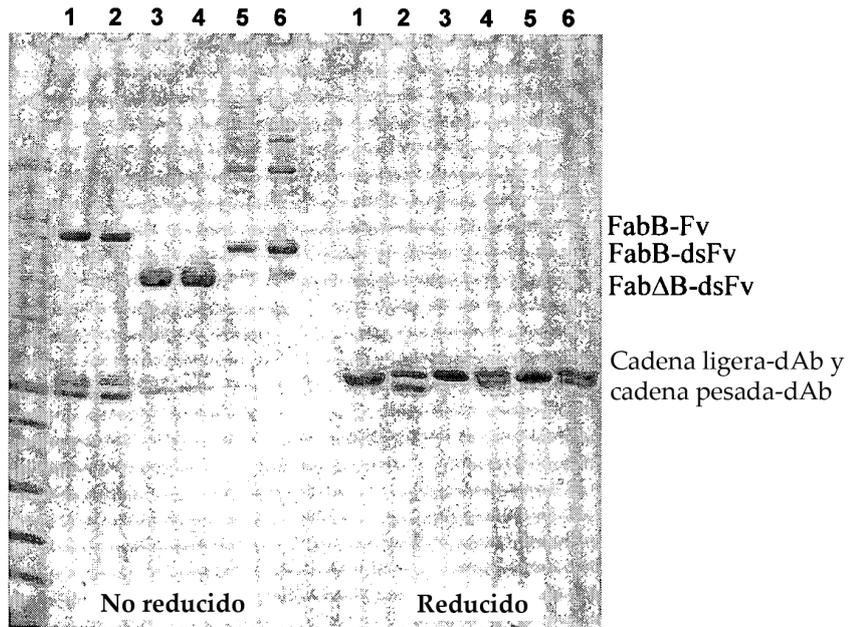


Figura 18



- 1 = FabB-645Fv (2xG₄S)
- 2 = FabB-648Fv (2xG₄S)
- 3 = FabΔB-645dsFv (2xG₄S)
- 4 = FabΔB-648dsFv (2xG₄S)
- 5 = FabB-645dsFv (2xG₄S)
- 6 = FabB-648dsFv (2xG₄S)

Figura 19

Análisis de exclusión molecular de **FabB-645Fv (2xG₄S)**, **FabB-645dsFv (2xG₄S)**, **FabΔB-645dsFv (2xG₄S)**

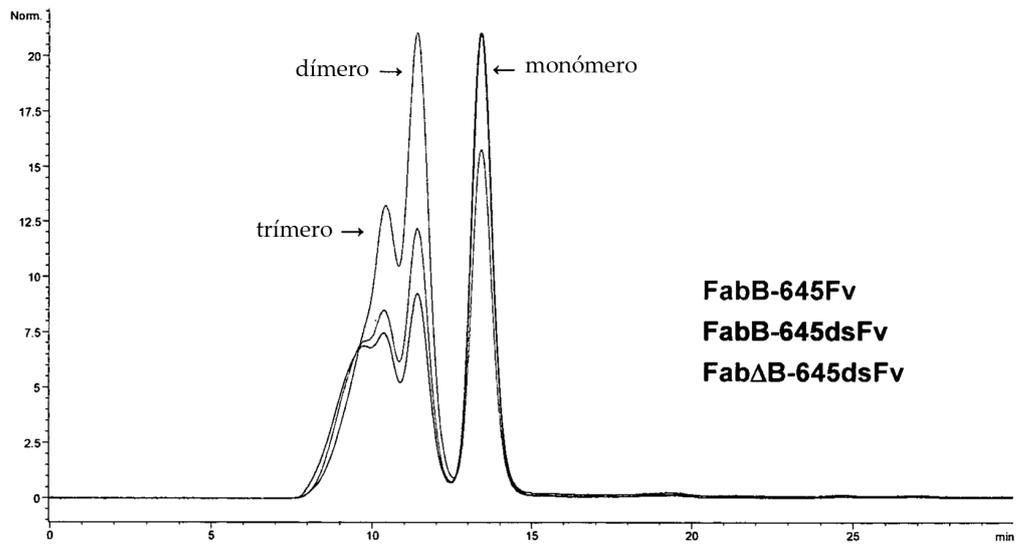


Figura 20

646Fv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 88)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 89)
 CDRH3 TVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 90)
 CDRL1 QSSPSVWSDFLS (SEQ ID NO: 91)
 CDRL2 GASTLAS (SEQ ID NO: 92)
 CDRL3 GGGYSSISD TT (SEQ ID NO: 93)

647Fv

CDRH1 GFTLSNNYWMC (SEQ ID NO: 94)
 CDRH2 CIYTGDDTAYTSWAKG (SEQ ID NO:95)
 CDRH3 SGGSYYDYVFIL (SEQ ID NO: 96)
 CDRL1 QASQSLGNRLA (SEQ ID NO: 97)
 CDRL2 RASTLAS (SEQ ID NO: 98)
 CDRL3 QCTYIGSKMGA (SEQ ID NO: 99)

648Fv es igual que un didAb de dAbH2, dAbL2

649Fv

CDRH1 GFSFSGNYWIC (SEQ ID NO: 100)
 CDRH2 CIFTADGDTAYTSWAKG (SEQ ID NO: 101)
 CDRH3 SGGSAFDYVFIL (SEQ ID NO: 102)
 CDRL1 QASQSIG NRLG (SEQ ID NO: 103)
 CDRL2 RASTLES (SEQ ID NO: 104)
 CDRL3 QCTYIGKLMGA (SEQ ID NO: 105)

645 Pesada I50AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 106)
 CDRH2 AIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 107)
 CDRH3 TVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 108)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 109)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 110)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 111)

Figura 21

645 Pesada T56AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 112)
 CDRH2 IIWASGATFYATWAKG (SEQ ID NO: 113)
 CDRH3 TVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 114)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 115)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 116)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 117)

645 Pesada T95AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 118)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 119)
 CDRH3 AVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 120)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 121)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 122)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 123)

645 Pesada V96AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 124)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 125)
 CDRH3 TAPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 126)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 127)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 128)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 129)

645 Pesada P97AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 130)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 131)
 CDRH3 TVAGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 132)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 133)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 134)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 135)

645 Pesada G98AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 136)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 137)
 CDRH3 TVPAYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 138)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 139)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 140)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 141)

Figura 22**645 Pesada Y99AFv**

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 142)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 143)
 CDRH3 TVPGASTAPYFDL (SEQ ID NO: 144)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 145)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 146)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 147)

645 Pesada S100AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 148)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 149)
 CDRH3 TVPGYATAPYFDL (SEQ ID NO: 150)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 151)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 152)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 153)

645 Pesada T100aAFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 154)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 155)
 CDRH3 TVPGYSAAPYFDL (SEQ ID NO: 156)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 157)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 158)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 159)

645 Pesada P100cAFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 160)
 CDRH2 IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 161)
 CDRH3 TVPGYSTAAAYFDL (SEQ ID NO: 162)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 163)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 164)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 165)

645 Pesada I50A+T95AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 166)
 CDRH2 AIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO: 167)
 CDRH3 AVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 168)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 169)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 170)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 171)

Figura 23

645 Pesada I50A+G98AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 172)
 CDRH2 AIWASGTTYATWAKG (SEQ ID NO: 173)
 CDRH3 TVPAYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 174)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 175)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 176)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 177)

645 Pesada I50A+Y99AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 178)
 CDRH2 AIWASGTTYATWAKG (SEQ ID NO: 179)
 CDRH3 TVPGASTAPYFDL (SEQ ID NO: 180)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 181)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 182)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 183)

645 Pesada T56A+T95AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 184)
 CDRH2 IIWASGATFYATWAKG (SEQ ID NO: 185)
 CDRH3 AVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 186)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 187)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 188)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 189)

645 Pesada T56A+G98AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 190)
 CDRH2 IIWASGATFYATWAKG (SEQ ID NO: 191)
 CDRH3 TVPAYSTAPYFDL (SEQ ID NO: 192)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 193)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 194)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 195)

645 Pesada T56A+Y99AFv

CDRH1 GIDLSNYAIN (SEQ ID NO: 196)
 CDRH2 IIWASGATFYATWAKG (SEQ ID NO: 197)
 CDRH3 TVPGASTAPYFDL (SEQ ID NO: 198)
 CDRL1 QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO: 199)
 CDRL2 EASKLTS (SEQ ID NO: 200)
 CDRL3 GGGYSSISDTT (SEQ ID NO: 201)

Figura 24

645dsFv - es un Fv estabilizado con disulfuro. El disulfuro puede introducirse en el Fv mediante la mutación doble en la cadena pesada G44C y en la cadena ligera G100C.

Cadena pesada de Fv

EVQLLES~~GGGL~~VQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWA
SGTTFYATWAKGRFTISR~~DS~~TTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPY
FDLWGQGT~~L~~VTVSS (SEQ ID NO: 202)

Cadena ligera de Fv

DIVMTQSPSSVSASVGD~~RV~~TITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEAS
KLTSGVPSR~~FK~~GSGSGTDF~~TL~~TISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD~~TT~~FGCGTKV
EIK (SEQ ID NO: 203)

648dsFv - es un Fv estabilizado con disulfuro. El disulfuro puede introducirse en el Fv mediante la mutación doble en la cadena pesada 44C y en la cadena ligera 100C.

Cadena pesada de Fv

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSR~~Y~~AMTWVRQAPGKCLEWIGTIT
TGGNTNYANWAKGRFTISK~~DS~~TTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYVSYA
DATELSLWGQGT~~L~~VTVSS (SEQ ID NO: 204)

Cadena ligera de Fv

DIVMTQSPSTLSASVGD~~RV~~TITCQASQSIGSRLAWYQQKPGKAPKLLIYYAST
VASGVPSR~~FK~~GSGSGTEFTLTISSLQPD~~F~~ATYYCQSYDYSSSSSYAFGCGTKV
EIK (SEQ ID NO: 205)

Mutaciones de estabilización o de solubilidad de Fv - mutaciones que aumentan la estabilidad, la solubilidad o la expresabilidad del Fv. Por ejemplo, en cadena pesada A84D.

Cadena pesada de 645Fv

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWA
SGTTFYATWAKGRFTISR~~DS~~TTVYLQMNSLR~~DE~~DTAVYYCARTVPGYSTAPY
FDLWGQGT~~L~~VTVSS (SEQ ID NO: 206)

Cadena ligera de 645Fv

DIVMTQSPSSVSASVGD~~RV~~TITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEAS
KLTSGVPSR~~FK~~GSGSGTDF~~TL~~TISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD~~TT~~FGGGTKV
EIK (SEQ ID NO: 207)

Figura 25

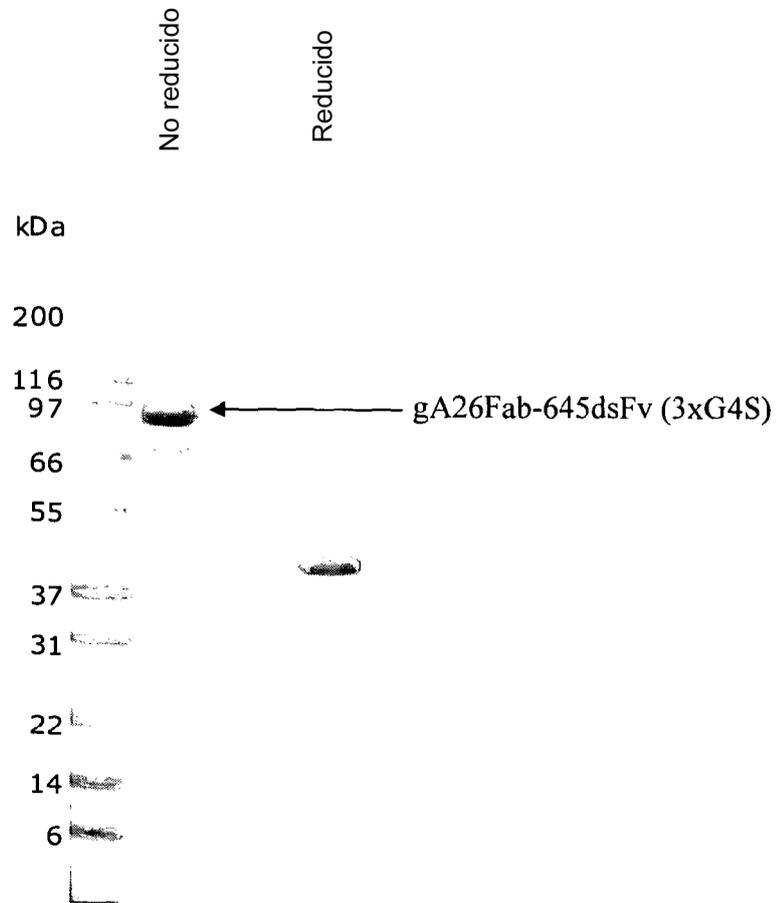


Figura 26

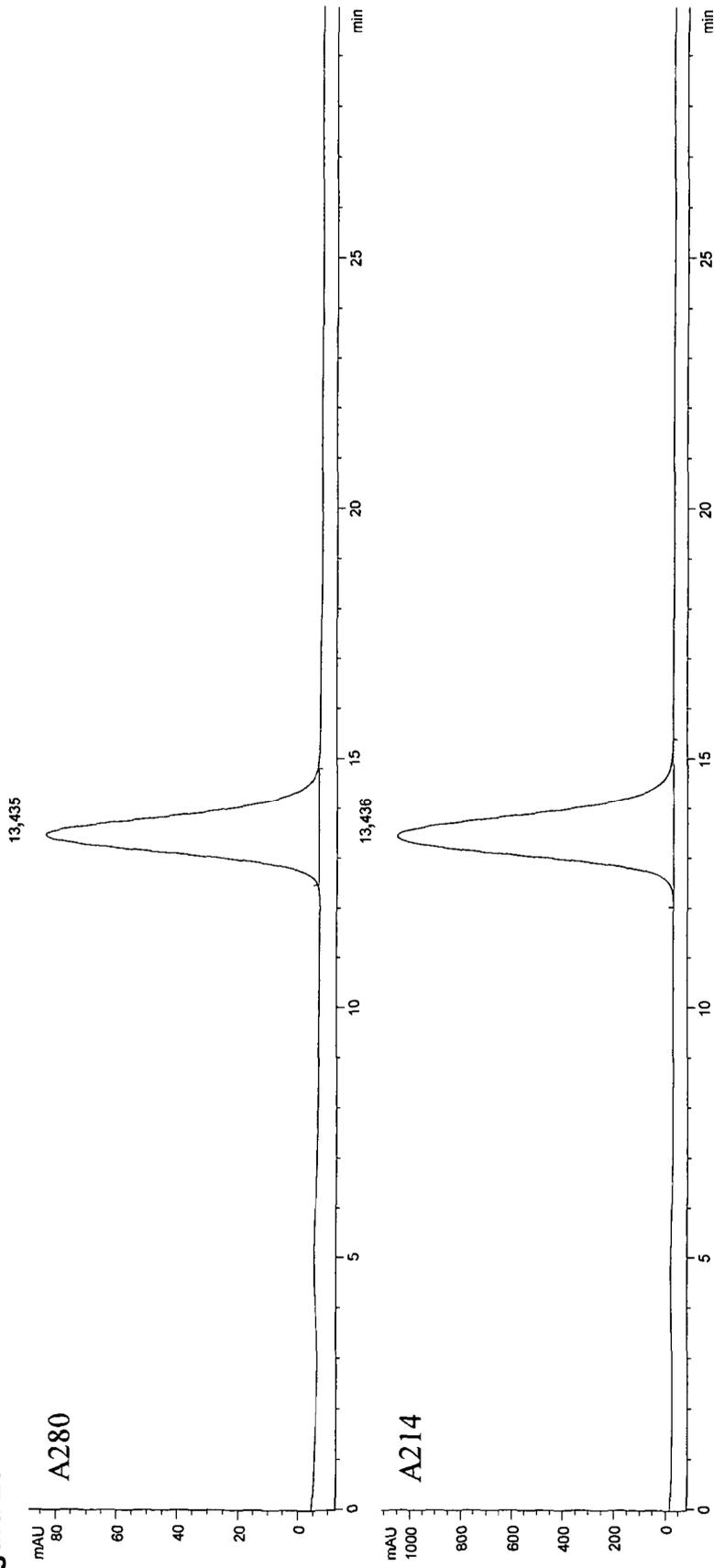


Figura 27A

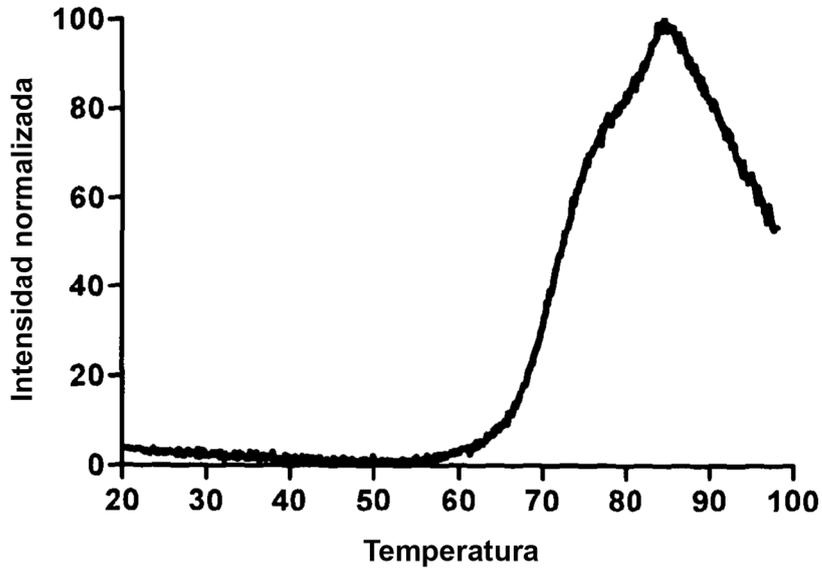


Figura 27B

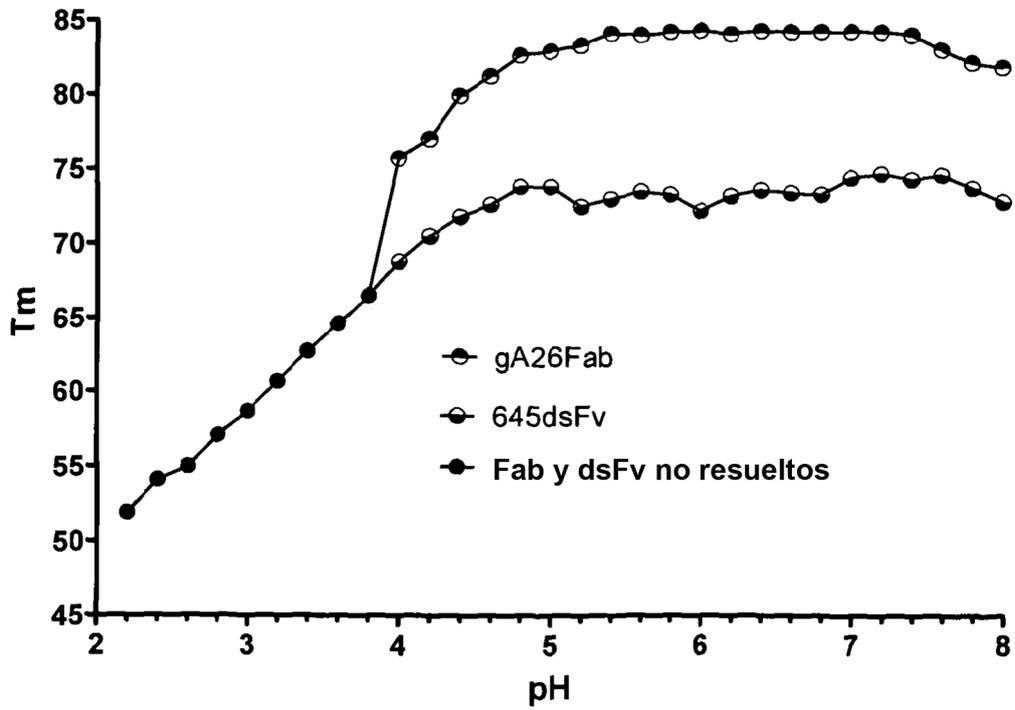


Figura 28

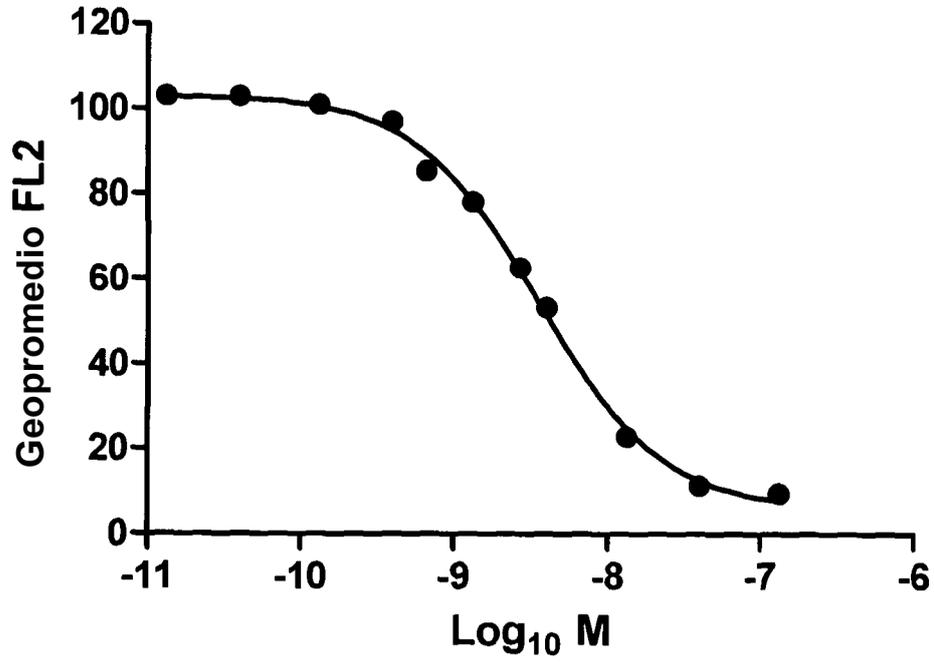
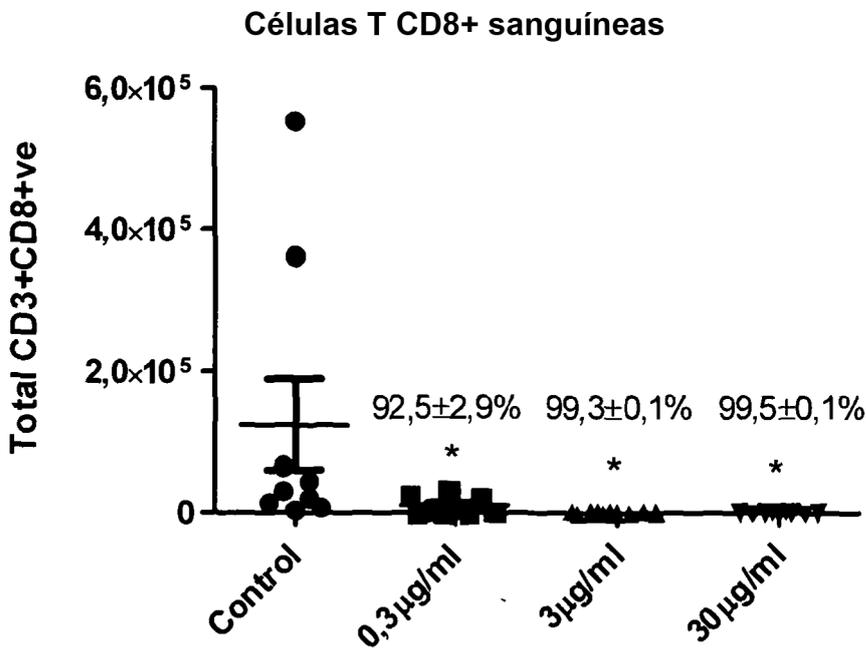
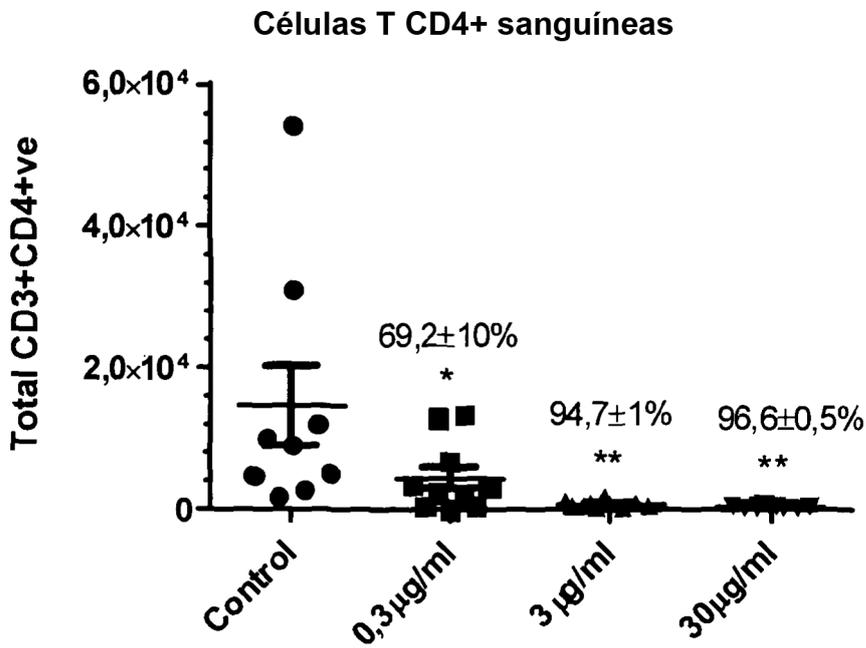
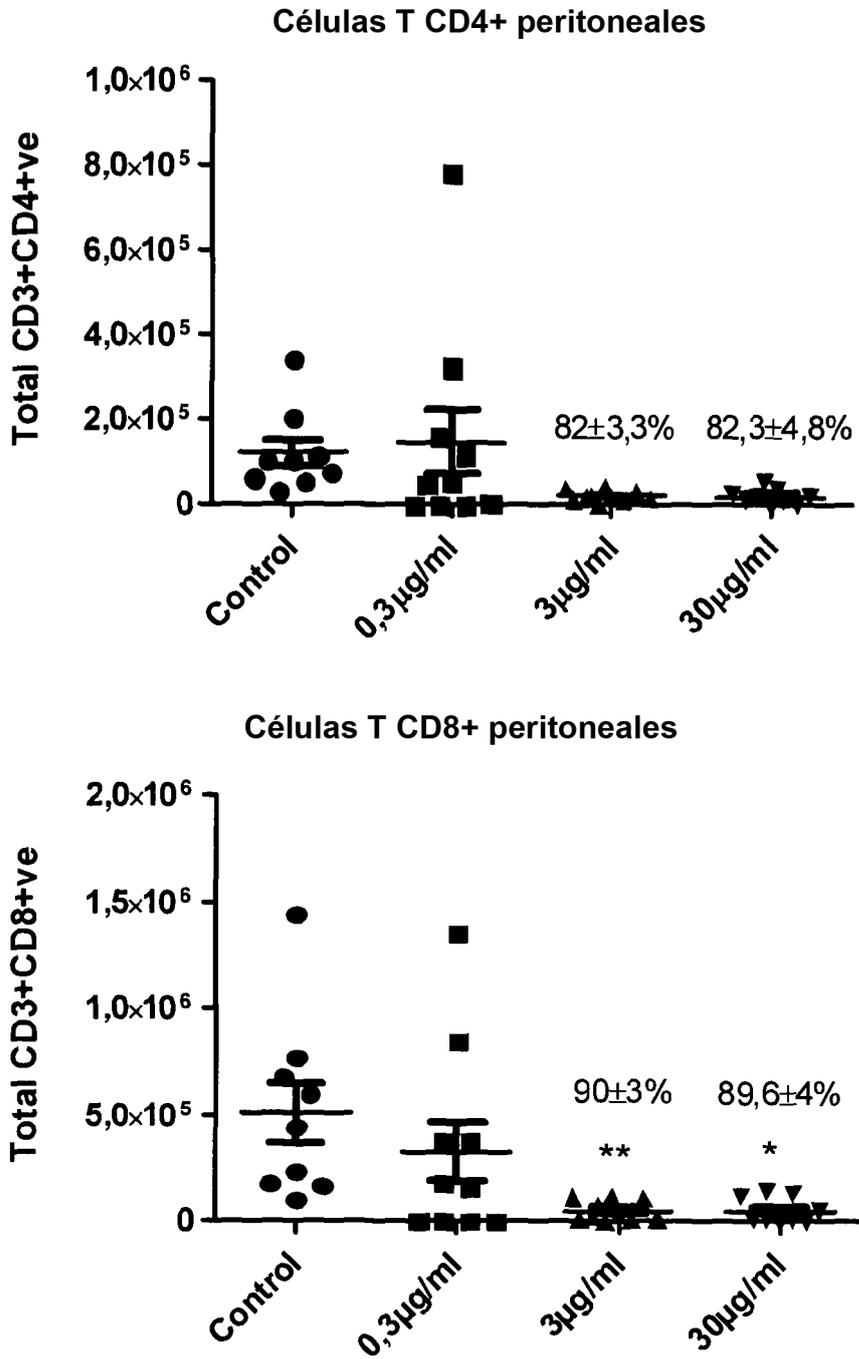


Figura 29A



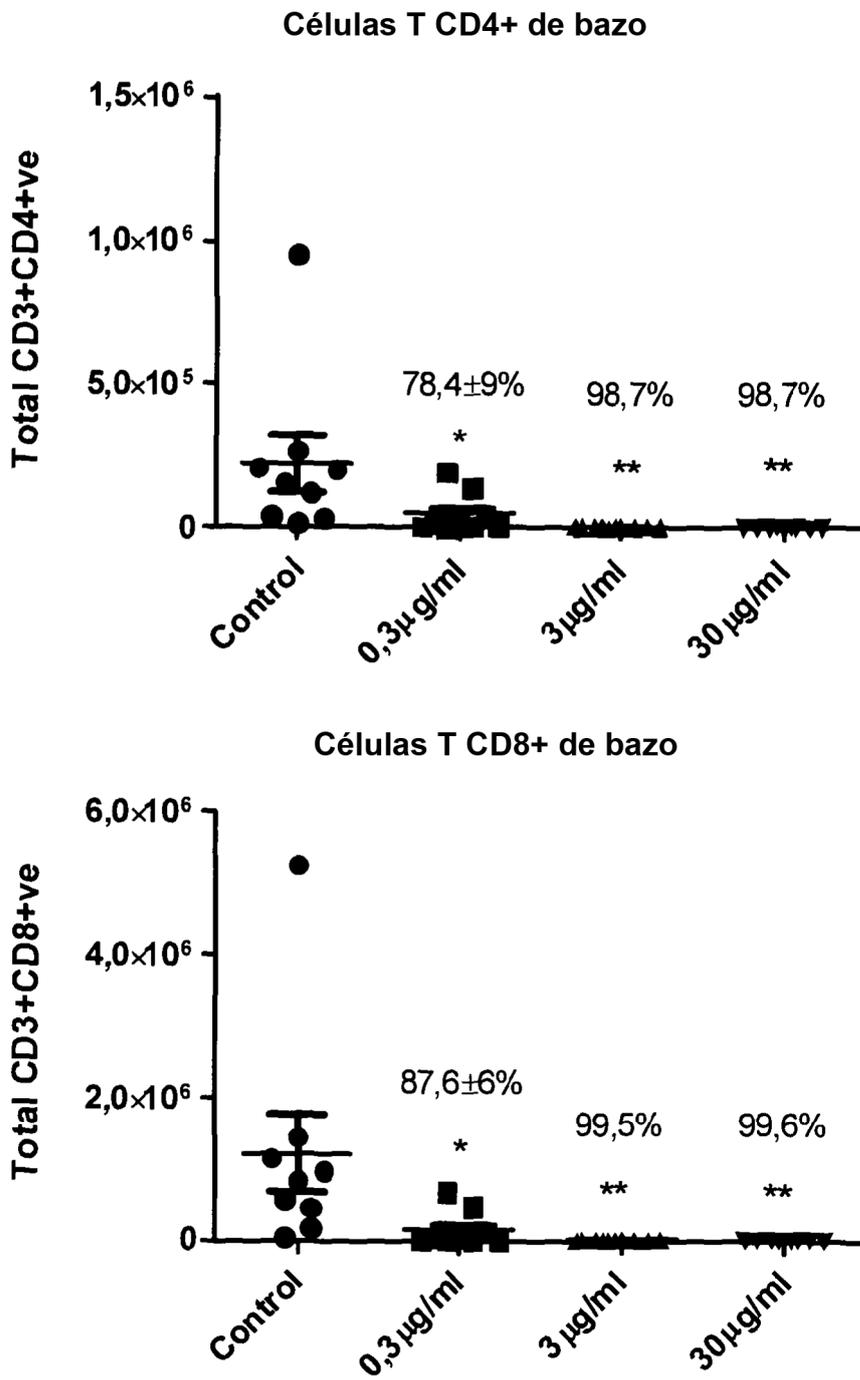
*P<0,05, **P<0,01

Figura 29B



*P<0,05, **P<0,01

Figura 29C



*P<0,05, **P<0,01

Figura 30A

Secuencia de aminoácidos de 645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)

Cadena pesada

645Fv (SEQ ID NO:52)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDTTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGL
VTVSS

Conector 3xG4S

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:225)

652Fab (SEQ ID NO:226)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSXXXXXXXXXXWIRQPPGKALEWLGX
XXXXXXXXXXRLTISRDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARXXXXXXXXXXWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVH TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCS

Cadena ligera

645Fv (SEQ ID NO:53)

DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS
GVPSRFKSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFIGQGTKVEIK

Conector 3xG4S

GGGGSGGGSGGGGS SEQ ID NO:225)

652Fab (SEQ ID NO:227)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCXXXXXXXXXXWYQQKPGKAPKLLIY
XXXXXXXXXG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCXXXXXXXXX
FGGGTKVEIKRTVAAPS VFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Los aminoácidos de las CDR de 652Fab han sido reemplazados por X.

Figura 30B

Secuencia de aminoácidos de 645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)

Cadena pesada

645Fv (SEQ ID NO:52)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDTTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTL
VTVSS

Conector ASTKGP

ASTKGP (SEQ ID NO:228)

652Fab SEQ ID NO:226)

QVTLKESGPVVLVKPTETLTLTCTVSXXXXXXXXXXWIRQPPGKALEWLGXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXRLTISRDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCS

Cadena ligera

645Fv (SEQ ID NO:53)

DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS
GVPSRFKSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGYSISDTTFGQGTKVEIK

Conector TVAAP

TVAAP (SEQ ID NO:229)

652Fab SEQ ID NO:227)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCXXXXXXXXXXWYQQKPGKAPKLLIYXXXXXXXXXG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECS

Los aminoácidos de las CDR de 652Fab han sido reemplazados por X.

Figura 30C

Secuencia de aminoácidos de 645dsFv-652Fab (L-3xG4S. H-3xG4S)

Cadena pesada

645Fv (SEQ ID NO:202)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSNYAINWVRQAPGK**C**LEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDTSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT
LTVSS

Conector 3xG4S (SEQ ID NO:225)

GGGGSGGGSGGGGS

652Fab (SEQ ID NO:226)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSXXXXXXXXXXXXWIRQPPGKALEWLXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXRLTISRDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCS

Cadena ligera

645Fv (SEQ ID NO:203)

DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS
GVPSRFKSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTT**F**GC**G**TKVEIK

Conector 3xG4S (SEQ ID NO:225)

GGGGSGGGSGGGGS

652Fab (SEQ ID NO:227)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCXXXXXXXXXXXXWYQQKPGKAPKLLIYXXXXXXXXXG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Las 2 cisteínas que forman el enlace disulfuro intercatenarios en el Fv se muestran en negrita.

Los aminoácidos de las CDR de 652Fab han sido reemplazados por X.

Figura 30D
Secuencia de aminoácidos de 645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)

Cadena pesada

645Fv (SEQ ID NO:202)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGK**C**LEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDTSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTL
VTVSS

Conector ASTKGP

ASTKGP (SEQ ID NO:228)

652Fab (SEQ ID NO:226)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSXXXXXXXXXXXXWIRQPPGKALEWLGX
XXXXXXXXXXRLTISRDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARXXXXXXXXXXXXWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCS

Cadena ligera

645Fv (SEQ ID NO:203)

DIVMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS
GVPSRFKSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCGGYSISDTT**F**CGTKVEIK

Conector TVAAP

TVAAP (SEQ ID NO:229)

652Fab (SEQ ID NO:227)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCXXXXXXXXXXXXWYQQKPGKAPKLLIYXXXXXXXXG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Las 2 cisteínas que forman el enlace disulfuro intercatenarios en el Fv se muestran en negrita.

Los aminoácidos de las CDR de 652Fab han sido reemplazados por X.

Figura 31**Concentración de 645Fv-652Fab en sobrenadantes de mamífero**

	$\mu\text{g/ml}$
645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	1,13
645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	0,86
645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	1,38
645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	0,77

Figura 32A

Unión de 645Fv-652Fab a albúmina de suero humana

Construcción	Analito	k_a ($\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-4} \text{s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} \text{M}$)
645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	HSA	2,55	3,11	1,22
645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	HSA	2,53	2,76	1,09
645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	HSA	2,37	2,75	1,16
645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	HSA	2,24	2,60	1,16

Figura 32B

Unión de 645Fv-652Fab a IL-13 humana

Construcción	Analito	k_a ($\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-4} \text{s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-10} \text{M}$)
645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	hIL13	1,40	1,77	1,26
645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	hIL13	1,54	1,42	0,92
645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	hIL13	3,36	2,07	6,16
645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	hIL13	4,01	2,10	5,23

Figura 32C

Unión dual de 645Fv-652Fab a HSA y hIL-13

Construcción	Analito	Unión (RU)	
645Fv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	hIL13	45	
	HSA	144	
	hIL13 + HSA	191	(189)
645dsFv-652Fab (L-3xG4S, H-3xG4S)	hIL13	37	
	HSA	120	
	hIL13 + HSA	165	(157)
645Fv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	hIL13	50	
	HSA	165	
	hIL13 + HSA	210	(215)
645dsFv-652Fab (L-TVAAP, H-ASTKGP)	hIL13	32	
	HSA	107	
	hIL13 + HSA	140	(139)