SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-297905- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 15:21:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

REPUBLICA DE COLOMBIA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No. _____

Contiene los documentos relativos a la solicitud de Patente de:

Título: DOMINIOS NO INMUNIZADOS QUE SE UNEN AL SUERO Y SU USO PARA EXTENDER LA VIDA MEDIA EN EL SUERO

Solicitante: MACROGENICS, INC.

De Rockvillle, Maryland. Estados Unidos de America

Apoderado: MAURICIO JARAMILLO C.

Bogotá, D.C., Diciembre de 2013

WF- 6682

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-297905- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 15:21:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	X Patente de invención X Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2012/038227	**Fecha**	16/05/2012
Publicación Internacional No.	WO/2012/162068	**Fecha**	29/11/2012

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

DOMINIOS NO INMUNIZADOS QUE SE UNEN AL SUERO Y SU USO PARA EXTENDER LA VIDA MEDIA EN EL SUERO

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

A61K 39/395(2006.01)

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1.	MACROGENICS, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	9640 Medical Center Drive	No. TELÉFONO	
CIUDAD	Rockville	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO	Maryland	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Estados Unidos de América
PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	HUANG	Ling	Estados Unidos de América
2.	JOHNSON	Leslie S.	Estados Unidos de América
3.	BONVINI	Ezio	Estados Unidos de América
4.	BARAT	Bashwati	Estados Unidos de América
5.			

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ REPRESENTANTE LEGAL X APODERADO

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
JARAMILLO CAMPUZANO	MAURICIO	C.C .80.421.942 T.P .74.555

DIRECCIÓN	Calle 67 NO. 7 – 35, oficina 1204	No. TELÉFONO	3192900
CIUDAD	Bogotá D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	jbenoit@gpzlegal.com
PAÍS	Colombia	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	**12-170684**

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD X SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/488,725	2011/05/21
2.				
3.				

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI X NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

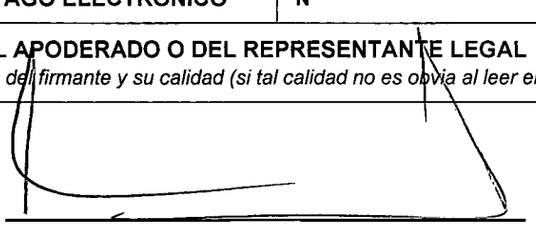
14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA X SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha

16 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)



17 ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. X Descripción — N° de folios: 249
2. X Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 24
3. ☐ Dibujos y/o figuras — N° folios:
4. X Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. X Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. X Poderes, si fuera el caso. Exp. No. **12-170684**
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. X Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad [X] PCT

(21) No. de solicitud:	(51) int. Cl: A61K 39/395(2006.01)
(22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s): MACROGENICS, INC.
(30) Prioridad: (31) No. Prioridad: 61/488,725 (32) Fecha: 21/05/2011 (33) País: Estados Unidos de América	(72) Inventor(es): Ling HUANG Leslie S. JOHNSON Ezio BONVINI Bashwati BARAT
	(74) Apoderado(s): MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO

(54) Título:

DOMINIOS NO INMUNIZADOS QUE SE UNEN AL SUERO Y SU USO PARA EXTENDER LA VIDA MEDIA EN EL SUERO

Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT

(85) Fecha límite inicio Fase Nacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha: 16/05/2012 No. de solicitud PCT: PCT/US2012/038227	(87) Publicación internacional Fecha: 29/11/2012 No. Publicación: WO/2012/162068

Resumen reivindicación (es):

La presente invención se refiere a un polipéptido (por ejemplo, una molécula que se une a los antígenos) que comprende una porción de polipéptido de una proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a dicha proteína del suero. La presencia de la proteína que se une al suero extiende la vida media sérica del polipéptido, con relación a la vida media sérica del polipéptido si carece de la porción de polipéptido de la proteína desinmunizada que se une al suero. La invención se refiere además a métodos y usos que emplean dichas moléculas.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Macroyen 46682

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 121541

Bogotá D.C., Noviembre 27 de 2013 - 15:10:31

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A. NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	199174640	26/11/2013	8.325.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-297905- -00000-0000
Fecha: 2013-12-20 15:21:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO Hacroapac 6682
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 124422

Bogotá D.C., Diciembre 03 de 2013 - 16:06:29

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A. NI 830.121.797 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	198581880	29/11/2013	19.641.000.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	613554841	02/12/2013	50.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
14	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	420.000.00
				$420.000.00

SON: **CUATROCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-297905- -00000-0000
Fecha: 2013-12-20 15:21:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 13 / 12 / 20 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
2020		3

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	13-297905	0	2
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	**Otro**
Item	***Soporte Documental***
4	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	**Otro**

Observaciones:

El 00 Anexo Contien un total de 1 Archivos, 1 en Formato pdf, los cuales fueron procesados

grisela

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-297905- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 15:21:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Título de la invención:

DOMINIOS NO INMUNIZADOS QUE SE UNEN AL SUERO Y SU USO PARA EXTENDER LA VIDA MEDIA EN EL SUERO

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas:

[0001] Esta Solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente de EE UU con Nro. de Serie **61/488.725** (presentada el 21 de Mayo 2011; pendiente) cuya solicitud se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

Referencia al Listado de Secuencias:

[0002] Esta Solicitud incluye uno o más Listados de Secuencias conforme a lo dispuesto en el 37 C.F.R. 1,821 *et seq*., que se divulgan tanto en papel como en medios susceptibles de leerse por computadora, y cuyas divulgaciones en papel y en medios susceptibles de leerse por computadora se incorporan en este documento a modo de referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención:

1. CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] La presente invención se refiere a un polipéptido (por ejemplo, una molécula que se une a los antígenos) que comprende una porción de polipéptido de una proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a dicha proteína del suero. La presencia de la proteína que se une al suero extiende la vida media sérica del polipéptido, con relación a la vida media sérica del polipéptido si carece de la porción de polipéptido de la proteína desinmunizada que se une al suero. La invención se refiere además a métodos y usos que emplean dichas moléculas.

[0004] La presente invención se refiere en forma particular a moléculas de diacuerpo, denominadas de otro modo como “reactivos de reorientación de afinidad dual” (“DARTS”), y sus usos en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, que incluyen trastornos inmunológicos y cánceres. Las moléculas de diacuerpo de la invención comprenden por lo menos dos cadenas de polipéptidos que se asocian para formar por lo menos dos sitios de unión a epítopes, que pueden reconocer los mismos epítopes u otros diferentes. En forma adicional, los epítopes pueden ser de las mismas o de diferentes moléculas o ubicarse en las mismas o en diferentes células. Las cadenas de polipéptidos individuales de la molécula de diacuerpo pueden unirse en forma covalente a través de enlaces covalentes unidos no peptídicos, tales como, aunque sin limitarse a, unión de disulfuro de residuos de cisteína ubicados dentro de cada cadena de polipéptido. En realizaciones particulares, las moléculas de diacuerpo de la presente invención comprenden en forma adicional una región de Fc, lo cual permite que el grupo funcional símil anticuerpo se diseñe en la molécula.

2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

[0005] El diseño de diacuerpos covalentes se basa en la construcción de Fv de cadena simple (scFv) (Holliger *et al.* (1993) “‘*Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody*

Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; incorporada en este documento en su totalidad a modo de referencia). En una IgG no modificada, intacta, los dominios VL y VH se ubican en cadenas de polipéptidos separadas, *es decir*, la cadena liviana y la cadena pesada, respectivamente. La interacción de una cadena liviana de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular, la interacción de los dominios VL y VH forma uno de los sitios que se unen al epítope del anticuerpo. En contraste, la construcción de scFv comprende un dominio VL y VH de un anticuerpo contenido en una cadena de polipéptido simple en donde los dominios se separan por medio de una ligadura flexible de suficiente longitud para permitir el auto-montaje de los dos dominios en un sitio de unión al epítope funcional. Donde el auto-montaje del dominio es imposible debido a una ligadura de longitud insuficiente (menos de alrededor de 12 residuos de aminoácidos), dos de las construcciones de scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente, el VL de una cadena que se asocia con el VH de la otra (revisado en Marvin *et al.* (2005) *"Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,"* Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Más aún, la incorporación de un residuo de cisteína al c-término de la construcción se ha demostrado que permite la unión de disulfuro de las cadenas de polipéptidos, estabilizando el dímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente (véase por ej., Olafsen *et al.* (2004) *"Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,"* Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27). Además, donde los dominios VL y VH de especificidad diferente se seleccionan, puede construirse una molécula no solo bivalente, sino también bi-específica.

[0006] Los diacuerpos bivalentes tienen un amplio rango de aplicaciones que incluyen terapia y diagnóstico inmunológico. La bivalencia permite la gran flexibilidad en el diseño e ingeniería del diacuerpo en varias aplicaciones, lo que proporciona aumento d ela avidez para antígenos multiméricos, el entrecruzamiento de diferentes antígenos, y orientación dirigida a tipos de células específicas que se basa en la presencia de ambos antígenos de destino. Debido a su mayor valencia, índices bajos de disociación y rápida depuración de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, en o por debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han mostrado uso particular en el campo de la toma de imágenes de tumores (Fitzgerald *et al.* (1997) *"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris,"* Protein Eng. 10:1221). Es de particular importancia el entrecruzamiento de diferentes células, por ejemplo el entrecruzamiento de células T citotóxicas a las células tumorales (Staerz *et al.* (1985) *"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,"* Nature 314:628-631, and Holliger *et al.* (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305). Los dominios de unión al epítope del diacuerpo también pueden orientarse a un determinante de superficie de cualquier célula generadora de respuesta inmunológica tales como CD3, CD16, CD32, o CD64, que se expresan en los linfocitos T, células asesinas

naturales (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, la unión del diacuerpo a determinantes de células generadoras de respuesta, *por ej.*, receptores Fcγ (FcγR), también se encontró que activan la célula generadora de respuesta (Holliger *et al.* (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) *"Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins,"* Cancer Res. 59:2909-2916). Normalmente, la activación de células generadoras de respuesta se desencadena por la unión de un anticuerpo que se une al antígeno a una célula generadora de respuesta por medio de interacción Fc-FcγR; de este modo, en este aspecto, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden exhibir funcionalidad similar a Ig independiente de si comprenden un dominio Fc (*por ej.*, como se evalúa en cualquier ensayo de la función generadora de respuesta conocido en la técnica o ejemplificado en este documento (*por ej.*, ensayo ADCC)). Por medio del entrecruzamiento de células tumorales y generadoras de respuesta, el diacuerpo no sólo lleva la célula generadora de respuesta dentro de la proximidad de las células tumorales sino que conduce a la matanza efectiva del tumor (véase por ej., Cao *et al.* (2003) *"Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics,"* Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197, incorporada en este documento en su totalidad a modo de referencia).

2.1 RECEPTORES DE CÉLULAS GENERADORAS DE RESPUSETA Y SUS FUNCIONES EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

[0007] En la función inmunológica tradicional la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunológico produce un amplio abanico de respuetas, que oscila desde funciones de generador de respuesta tales como citotoxicidad que depende de los anticuerpos, desgranulación de mastocitos, y fagocitosis a las señales inmuno moduladoras tales como regular la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o complejos inmunológicos a los receptores de la superficie celular especializados sobre células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por los anticuerpos y los complejos inmunológicos se obtiene de la heterogeneidad estructural de los receptores de Fc. Los receptores de Rf comparten dominios de unión al antígeno estructualmente relacionados que supuestamente median la señalización intracelular.

[0008] Los receptores Fcγ, miembros de la súper familia del gen de inmunoglobulina de las proteínas, son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la porción Fcγ de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento sobre la cadena alfa del receptor Fcγ. Los receptores Fcγ se definen por su especificidad por los sub-tipos de inmunoglobulina. Los receptores Fcγ para IgG se denominan como FcγR, para IgE como FcεR, y para IgA como FcαR. Las diferentes células accesorias llevan receptores Fcγ para anticuerpos de

diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias se verán comprometidas en una respueta dada (revisado por Ravetch J.V. *et al.* (1991) "*Fc Receptors,*" Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. *et al.* (2001) "*Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fcgamma Receptors*," Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. *et al.* (2002), *"ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation,"* The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-168l; Ravetch J.V. *et al.* (2000) *"Immune Inhibitory Receptors,"* Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. *et al.*, (2001) "*IgG Fc Receptors*," Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) *"Fc Receptors: Rubor Redux,"* Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores de Fcγ, las células que los expresan, y su especificidad por los isotipos se resume en la Tabla 1 (adaptada de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York).

Receptores de Fcγ

[0009] Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de la membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un dominio de abanico de membrana única y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Existen tres FcγRs conocidos, designados FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), y FcγRIII(CD16). Los tres receptores están codificados por genes distintivos; sin embargo, la homología extensiva entre los tres miembros de la familia sugiere que surgen de un progenitor común quizas por duplicación génica.

FcγRII(CD32)

[0010] Las proteínas FcγRII son glicoproteínas de membrana integral de 40 kDa que sólo se unen a la IgG que forma complejo debido a una baja afinidad por Ig monomérico (10^6 M^{-1}). Este receptor es el FcγR expresado más ampliamente, presente en todas las células hematopoyéticas, que incluyen monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos, y plaquetas. El FcγRII tiene sólo dos regiones con aspecto de inmunoglobulina en su cadena de unión a la inmunoglobulina y por lo tanto una afinidad mucho más baja por IgG que FcγRI. Existent res genes FcγRII humanos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), la totalidad de los cuales se unen a IgG en agregados o complejos inmunológicos.

[0011] Distintas diferencias dentro de los dominios citoplasmático deFcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas heterogeneas funcionalmente a la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular tales como fagocitosis y estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitorias, *por ej.*, al inhibir la activación de células B.

FcγRIII (CD16)

[0012] Debido a la heterogeneidad dentro de esta clase, el tamaño de FcγRIII oscila entre 40 y 80 kDa en el ratón y en el hombre. Dos genes humanos codifican dos transcripciones, FcγRIIIA, una glicoproteína de membrana integral, y FcγRIIIB, una versión ligada a

glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen murino codifica un FcγRIII homólogo al abanico de membrana FcγRIIIA humano. El FcγRIII comparte características estructurales con cada uno de los otros dos FcγRs. Como FcγRII, FcγRIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los correspondientes dos dominios similares a Ig extracelular. FcγRIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos y es el único FcγR en células NK. El FcγRIIIB ligado a GPI se conoce actualmente porque se expresa sólo en neutrófilos humanos.

Señalización a través de FcγRs

[0013] Ambas señales de activación e inhibición se transducen a través de los FcγRs luego de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas son el resultado de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplasmática del receptor llamado tirosina inmuno receptora basada en motivos de activación (ITAMs) o tirosina inmuno receptora basada en motivos de inhibición (ITIMS) justifican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas para estas estructuras dicta la evolución de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras los complejos que contienen ITIM solo incluyen FcγRIIB.

[0014] Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La agrupación génica de FcγRIIA por medio de complejos inmunológicos o entrecruzamiento específico de anticuerpos sirve para agregar ITAM junto con las quinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM como sitio de anclaje para la quinase Syk, cuya activación produce la activación de los sustratos descendentes (*por ej.*, PI_3K). La activación cellular conduce a la liberación de mediadores pro inflamatorios.

[0015] El gen FcγRIIB se exprea en linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico a FcγRIIA y se une a complejos IgG en un modo no distinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático de FcγRIIB define esta sub-clase inhibidora de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se liga conjuntamente con un FcγR de activación, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inosital polifosfato 5'-phosphatase (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de quinase de tirosina FcγR que contiene ITAM, lo que previene, como consecuencia, el flujo hacia adentro de Ca^{++} extracelular. De este modo el entrecruzamiento de FcγRIIB humedece la respuesta de activación para la ligación de FcγR e inhibe la sensibilidad celular. La activación de las células B, proliferación de las células B y secreción de anticuerpos de este modo se interrumpe.

TABLA 1. Receptores para las Regiones Fc de isotipos de Inmunoglobulina			
Receptor	**Unión**	**Tipo de Célula**	**Efecto de la ligación**
FcγRI (CD64)	IgG1 10^8 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Simulación de la captación Activación del estallido respiratorio Inducción de la matanza
FcγRII-A (CD32)	IgG1 2 x 10^6 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhan	Lberación de gránulos de captación
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1 2 x 10^6 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Inhibición de la estimulación de captación
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1 2 x 10^6 M^{-1}	Células B Mastocitos	Sin captación Inhibición de la simulación
FcγRIII (CD16)	IgG1 5 x 10^5 M^{-1}	Células NK Eosinófilo Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Inducción de la matanza
FcεRI	IgE 10^{10} M^{-1}	Mastocitos Eosinófilo Basófilos	Secreción de gránulos
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Inducción de la matanza por recaptación

3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0016] La presente invención se refiere en particular a diacuerpos covalentes y/o moléculas de diacuerpo covalentes y a su uso en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos que incluyen cáncer, trastornos autoinmunes, trastornos alérgicos y enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos o virus. Con preferencia, el diacuerpo de la presente invención puede unirse a dos epítopes diferentes en dos células diferentes en donde el primer epítope se expresa en un tipo de célula diferente que el segundo epítope, de manera tal que el diacuerpo pueda unir las dos células.

[0017] En detalle, la invención proporciona un polipéptido (y en esencia una molécula que se une a los antígenos) que comprende una cadena de polipéptido que comprende una porción de una proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a dicha proteína del suero; en donde dicha porción de la proteína que se une al suero extiende la vida media sérica de dicho polipéptido, con relación a la vida media sérica de dicho polipéptido si carece de dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero.

[0018] La invención se refiere además a los usos de (o métodos que implican el uso de) dicha porción de polipéptidos de una proteína desinmunizada que se une al suero para extender la vida media sérica de un polipéptido que se une en forma covalente al anterior, la extensión de la vida media sérica es con relación a la vida media sérica de la molécula que se une al antígeno si se carece de la proteína que se une a la albúmina.

[0019] La invención en forma adicional se refiere a la realización del polipéptido o los usos mencionados con anterioridad, en donde la cadena de polipeptido comprende una porción adicional de una proteína desinmunizada que se une al suero, en donde las porciones de la proteína desinmunizada que se une al suero son ambas capaces de unirse a la proteína del suero.

[0020] La invención se refiere en particular a la realización de los polipéptidos o los usos mencionados con anterioridad en donde la porción del polipéptido de la proteína desinmunizada que se une al suero es un dominio que se une a la albúmina (ABD) de una Proteína G de Estreptococo, o su variante que se une a la albúmina, y en especial en donde el dominio que se une a la albúmina (ABD) de la Proteína G de Estreptococo es un dominio que se une a la albúmina 3 (ABD3) de la cepa de la Proteína G de Estreptococo G148.

[0021] La invención se refiere en particular a la realización de los polipéptidos o los usos mencionados con anterioridad en donde el dominio que se une a la albúmina comprende:

(A) una variación de valina a alanina en la posición 71, en la posición 74, o en la posición 79;

(B) una variación de leucina a alanina en la posición 64, variación de isoleucina a alanina en la posición 65, y variación de valina a alanina en la posición 71; o

(C) una variación de asparagina a ácido aspártico en la posición 66, una sustitución de treonina a serina en la posición 70, y una variación de valina a alanina en la posición 71.

[0022] La invención se refiere en forma adicional a la realización de los polipéptidos o los usos mencionados con anterioridad en donde el dominio que se une a la albúmina tiene la secuencia de la SEC ID NRO.: 304, SEC ID NRO.: 323, SEC ID NRO.: 324, SEC ID NRO.: 325, SEC ID NRO.: 326, SEC ID NRO.: 327, SEC ID NRO.: 328, o SEC ID NRO.: 329.

[0023] La invención se refiere en forma adicional a la realización de las moléculas que se unen al antígeno o los usos descritos con anterioridad en donde la molécula que se une al antígeno es una molécula que se une a los antígenos. La invención se refiere en forma adicional a la realización en la cual la molécula que se une al antígeno es un diacuerpo compuesto por lo menos por una primera y una segunda cadena de polipéptidos las cuales interactúan entre sí para formar dos sitios que se unen al antígeno, en donde por lo menos una de las cadenas de polipéptidos comprende la segunda porción de polipéptidos que comprende la porción de la proteína desinmunizada que se une al suero que es capaz de unirse a la proteína sérica. La invención se refiere en forma adicional a la realizacións de dichos

diacuerpos en donde tanto la primera como la segunda cadenas de polipéptidos comprenden segundas porciones de polipéptidos que comprenden la porción de la proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a la proteína sérica y/o en donde la primera y la segunda cadenas de polipéptidos se unen en forma covalente entre sí.

[0024] La invención se refiere en particular a la realización de los diacuerpos o los usos mencionados con anterioridad, en donde el diacuerpo binds to:

(A) el receptor del Grupo 2D Asesino Natural o el receptor de células T (TCR); y

(B) un antígeno asociado con el tumor

[0025] La invención se refiere en particular a la realización de la totalidad de los diacuerpos o los usos mencionados con anterioridad, en donde el antígeno es un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovarios, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer de cuello de útero, un antígeno de cáncer de páncreas, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer de vesícula, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer de testículos, un antígeno de cáncer de glioblastoma, un antígeno asociado con una enfermedad de las células B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma no de Hodgkins, o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

[0026] En una realización, la presente invención se refiere a un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítope, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítope, y, en forma opcional, (iii) un tercer dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; cuya segunda cadena de polipéptidos comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y, en forma opcional, (iii) un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido están ligadas en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítope.

[0027] En otra realización, la presente invención se refiere a un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; cuya segunda cadena de polipéptidos comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el tercero y cuarto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido están ligadas en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítope.

[0028] En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a una molécula de diacuerpo, cuya molécula comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; cuya segunda cadena de polipéptidos comprende **(i)** un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y **(iii)** un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido están ligadas en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar

un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítope.

[0029] En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, cada molécula de diacuerpo que comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y cuya segunda cadena de polipéptidos comprende **(i)** un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y **(iii)** un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido de cada molécula de diacuerpo están ligados en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítope.

[0030] Incluso, en otras realizaciones, la presente invención se refiere a un diacuerpo tetra específico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, la primera molécula de diacuerpo que comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y cuya segunda cadena de polipéptidos comprende **(i)** un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda

inmunoglobulina (VL2), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y **(iii)** un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido están ligadas en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítope; y the second diabody molecule que comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica para un tercer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un cuarto epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y cuya segunda cadena de polipéptidos comprende **(i)** un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la cuarta inmunoglobulina (VL4), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3), y **(iii)** un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido están ligadas en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL3) (VH3) que se une al tercer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL4) (VH4) que se une al cuarto epítope.

[0031] En ciertos aspectos de la invención el primer epítope, segundo epítope, y donde corresponda, tercer epítope y cuarto epítope pueden ser iguales. En otros aspectos, el primer epítope, segundo epítope, y donde corresponda, tercer epítope y cuarto epítope pueden cada uno ser diferentes entre sí. En ciertos aspectos de la invención que comprende un tercer dominio que se une al epítope, el primer epítope y tercer epítope pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la invención que comprende un cuarto dominio que se une al epítope, el primer epítope y cuarto epítope pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la invención que comprende un tercer dominio que se une al epítope, el segundo epítope y tercer epítope

pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la invención que comprende un cuarto dominio que se une al epítope, el segundo epítope y cuarto epítope pueden ser iguales. In preferred aspects de la invención, el primer epítope y segundo epítope son diferentes. Incluso en otras realizaciones de la invención que comprende un tercer dominio que se une al epítope y un cuarto dominio que se une al epítope, el tercer epítope y cuarto epítope pueden ser diferentes. Se debe entender que cualquier combinación de los anteriores se abarca en la presente invención.

[0032] En particular aspects de la invención, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o molécula del diacuerpo pueden derivar de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto, el segundo domino y el cuarto dominio del diacuerpo o molécula del diacuerpo pueden derivar de la misma inmunoglobulina. Incluso en otro aspecto, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o molécula del diacuerpo pueden derivar de una inmunoglobulina diferente. Incluso en otro aspecto, el segundo domino y el cuarto dominio del diacuerpo o molécula del diacuerpo pueden derivar de una inmunoglobulina diferente. Se debe entender que cualquier combinación de los anteriores se abarca en la presente invención.

[0033] En ciertos aspectos de la invención, la ligadura covalente entre la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido del diacuerpo o molécula del diacuerpo can be por medio de una unión de disulfuro entre por lo menos un residuo de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido y por lo menos un residuo de cisteína sobre la segunda cadena de polipéptido. Los residuos de cisteína sobre la primera y la segunda cadenas de polipéptidos que son responsables de la unión de disulfuros pueden encontrarse en cualquier lugar sobre la cadena de polipeptido que incluyen dentro del primero, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto dominos. En una realización específica el residuo de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido se encuentra en el primer dominio y el residuo de cisteína sobre la segunda cadena de polipéptido se encuentra en el quinto dominio. El primero, segundo, cuarto y quinto dominos corresponden a las regiones variables responsables de la unión. En realizaciones preferidas, los residuos de cisteína responsables de la unión de disulfuros entre la primera y la segunda cadena de polipéptidos se ubican dentro del tercero y sexto dominios, respectivamente. En un aspecto particular de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**, que pueden codificarse por medio de la secuencia de aminoácidos **(SEC ID NRO.: 17)**. En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**, que pueden codificarse por medio de la secuencia de aminoácidos **(SEC ID NRO.: 17)**. In still another aspect de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**, derivada del dominio de bisagra de una IgG humana, y que pueden codificarse por medio de la secuencia de nucleótidos **(SEC ID**

NRO.: 78). En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena de polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**, derivada del dominio de bisagra de una IgG humana, y que pueden codificarse por medio de la secuencia de nucleótidos **(SEC ID NRO.: 78)**. En ciertos aspectos de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**; y el sexto dominio de la segunda cadena de polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**. En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**; y el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**. Incluso en otras realizaciones de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**; y el sexto dominio de la segunda cadena de polipéptido comprende a hinge domain. En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**; y el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende el dominio de bisagra. Incluso en otras realizaciones de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**; y el sexto dominio de la primera cadena de polipéptido comprende un dominio Fc, o porción de los anteriores. Incluso en otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena de polipéptido comprende los 6 aminoácidos de extremo terminal Ces de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**; y el tercer dominio de la primera cadena de polipéptido comprende un dominio Fc, o porción de los anteriores.

[0034] En otras realizaciones, los residuos de cisteína en el primero o segundo polipéptido que son responsables de la unión de disulfuros pueden ubicarse fuera del primero, segundo o tercer dominio sobre la primera cadena de polipéptido y fuera del cuarto, quinto y sexto dominio sobre la segunda cadena de polipéptido. En particular, el residuo de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el primer dominio o puede ser de extremo terminal C para el primer dominio. El residuo de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el segundo domino o can be de extremo terminal C to el segundo domino. El residuo de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el tercer dominio o puede ser de extremo terminal C para el tercer dominio. Además, el residuo de cisteína sobre la segunda cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el cuarto dominio o puede ser de extremo terminal C para el cuarto dominio. El residuo de cisteína sobre la segunda cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el quinto

dominio o puede ser de extremo terminal C para el quinto dominio. De acuerdo con lo anterior, el residuo de cisteína sobre la segunda cadena de polipéptido puede ser de extremo terminal C para el sexto dominio o puede ser N-terminal para el sexto dominio. En un aspecto particular, la unión de disulfuro puede ser entre por lo menos dos residuos de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido y por lo menos dos residuos de cisteína sobre la segunda cadena de polipéptido. En un aspecto particular, en donde el tercer dominio y sexto dominio no comprenden un dominio Fc, o porción de los anteriores, el residuo de cisteína puede estar en el C-término de la primera cadena de polipéptido y en el C-término de la segunda cadena de polipéptido. Se debe entender que cualquier combinación de los anteriores se abarca en la presente invención.

[0035] En realizaciones específicas de la invención como se describió con anterioridad, el diacuerpo covalente de la invención abarca dímeros de moléculas de diacuerpo, en donde cada molécula de diacuerpo comprende a first y la segunda cadena de polipéptido. En ciertos aspectos de esta realización las moléculas de diacuerpo pueden estar ligadas en forma covalente para formar el dímero, con la salvedad de que la ligadura covalente no es una unión peptídica. En aspectos preferidos de esta realización, la ligadura covalente es una unión de disulfuro entre por lo menos un residuo de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido de cada una de las moléculas de diacuerpo del dímero. Incluso en otros aspectos preferidos de esta invención, la ligadura covalente es una unión de disulfuro entre por lo menos un residuo de cisteína sobre la primera cadena de polipéptido de cada una de las moléculas de diacuerpo forming el dímero, en donde dicho por lo menos un residuo de cisteína se ubica en el tercer dominio de cada primera cadena de polipéptido.

[0036] En ciertos aspectos de la invención, el primer dominio sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el segundo domino o puede ser de extremo terminal C para el segundo domino. El primer dominio sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el tercer dominio o puede ser de extremo terminal C para el tercer dominio. El segundo domino sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el primer dominio o puede ser de extremo terminal C para el primer dominio. Además, el segundo domino sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el tercer dominio o puede ser de extremo terminal C para el tercer dominio. De acuerdo con lo anterior, el tercer dominio sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el primer dominio o puede ser de extremo terminal C para el primer dominio. El tercer dominio sobre la primera cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el segundo domino o puede ser de extremo terminal C para el segundo domino. Con respecto a la segunda cadena de polipéptido, el cuarto dominio puede ser N-terminal para el quinto dominio o puede ser de extremo terminal C para el quinto dominio. El cuarto dominio puede ser N-terminal para el sexto dominio o puede ser de extremo terminal C para el sexto dominio. El quinto dominio sobre la segunda cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el cuarto dominio o puede

ser de extremo terminal C para el cuarto dominio. El quinto dominio sobre la segunda cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el sexto dominio o puede ser de extremo terminal C para el sexto dominio. De acuerdo con lo anterior el sexto dominio sobre la segunda cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el cuarto dominio o puede ser de extremo terminal C para el cuarto dominio. El sexto dominio sobre la segunda cadena de polipéptido puede ser N-terminal para el quinto dominio o puede ser de extremo terminal C para el quinto dominio. Se debe entender que cualquier combinación de los anteriores se abarca en la presente invención.

[0037] En ciertas realizaciones, el primer dominio y el segundo dominio puede ubicarse en el extremo terminal C al tercer dominio sobre la primera cadena de polipéptido; o el primer dominio y el segundo dominio pueden ubicarse en el extremo terminal N al tercer dominio sobre la primera cadena de polipéptido. Con respecto a la segunda cadena de polipéptido, el cuarto dominio y quinto dominio puede ubicarse en el extremo terminal C al sexto dominio, o el cuarto dominio y quinto dominio pueden ubicarse en el extremo terminal N al sexto dominio. En ciertos aspectos de esta realización, la presente invención se refiere a un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, cada molécula de diacuerpo que comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope y en donde el tercer dominio se ubica en el extremo terminal N tanto para el primero como el segundo dominio; y cuya segunda cadena de polipéptidos comprende **(i)** un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y **(iii)** un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido de cada molécula de diacuerpo están ligados en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítope.

[0038] Incluso en otra realización, la presente invención se refiere a un diacuerpo tetra específico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, la primera molécula de diacuerpo que comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope y en donde el tercer dominio se ubica en el extremo terminal N tanto para el primero como el segundo dominio; y cuya segunda cadena de polipéptidos comprende **(i)** un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la segunda inmunoglobulina (VL2), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y **(iii)** un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido están ligadas en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítope; y the second molécula del diacuerpo comprende una primera o una segunda cadena de polipéptidos, cuya primera cadena de polipéptidos comprende **(i)** un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica para un tercer epítope, **(ii)** un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un cuarto epítope y **(iii)** un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción de los anteriores, cuyo primero y segundo dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el primero y segundo dominios no se asocian para formar un sitio que se une al epítope y en donde el tercer dominio se ubica en el extremo terminal N tanto para el primero como el segundo dominio; y cuya segunda cadena de polipéptidos comprende **(i)** un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena liviana de la cuarta inmunoglobulina (VL4), **(ii)** un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3), y **(iii)** un sexto dominio que comprende por lo menos un residuo de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están ligados en forma covalente de manera tal que el cuarto y quinto dominios no se asocian

para formar un sitio que se une al epítope; y en donde la primera cadena de polipéptido y la segunda cadena de polipéptido están ligadas en forma covalente, con la salvedad de que el enlace covalente no es una unión peptídica; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL3) (VH3) que se une al tercer epítope; en donde el segundo domino y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL4) (VH4) que se une al cuarto epítope.

[0039] Como se discutió con anterioridad, los dominios on las cadenas de polipéptidos individuales están ligados en forma covalente. En aspectos específicos, el enlace covalente entre el primero y el segundo dominio, primero y tercer dominio, segundo y tercer dominio, cuarto y quinto dominio, cuarto y sexto dominio, y/o quinto y sexto dominio pueden ser una unión de péptidos. En particular, el primero y segundo dominios, y el cuarto y quinto dominios pueden separarse mediante el tercer dominio y sexto dominio, respectivamente, o por residuos adicionales de aminoácidos, en la medida que el primero y segundo, y cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión. La cantidad de residuos de aminoácidos puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de aminoácidos. En un aspecto preferido, la cantidad de residuos de aminoácidos entre los dominios es 8.

[0040] En ciertos aspectos de la invención, los dominios de la primera y segunda cadena de polipéptidos que comprende un dominio Fc, *es decir*, en forma opcional, el tercero y sexto dominios, respectivamente, pueden comprender en forma adicional un dominio de bisagra de manera tal que el dominio comprende una región de bisagra-Fc. En realizaciones alternativas, la primera cadena de polipéptido o la segunda cadena de polipéptido pueden comprender un dominio de bisagra sin comprender además un dominio Fc. Las cadenas pesadas, cadenas livianas, regiones de bisagra, dominios Fc, y/o dominiso Fc de bisagra para usar en la invención pueden derivar de cualquier tipo de inmunoglobulina que incluyen IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En un aspecto preferido, el tipo de inmunoglobulina es IgG, o cualquier sub-tipo de los anteriores, *es decir*, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4. En otros aspectos, la inmunoglobulina de la cual derivan las cadenas liviana y pesada es humanizada o quimerizada.

[0041] Además, el primer epítope y segundo epítope, y, donde corresponda, tercer epítope y cuarto epítope, al cual el diacuerpo o molécula del diacuerpo se une pueden ser diferentes epitopes del mismo antígeno o pueden ser diferentes epitopes de diferentes antígenos. Los antígenos pueden ser cualquier molécula a la cual puede generarse un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de la superficie celular, marcadores autoinmunes, proteínas virales, fármacos, etc. En aspectos particulares, por lo menos un sitio de unión al epítope del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tales como una célula B, una célula T, una célula fagocítica, una célula asesina natural (NK) o una célula dendrítica.

[0042] En ciertos aspectos de la realización preferida, por lo menos un sitio de unión al epítope del diacuerpo o molécula del diacuerpo es específico para un receptor de Fc, cuyo

receptor de Fc puede ser un receptor de Fc de activación o un receptor de Fc de inhibición. En aspectos particulares, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ, y el receptor de Fcγ es un receptor FcγRI, FcγRII o FcγRIII. En aspectos más preferidos, el receptor de FcγRIII es el receptor de FcγRIIIA (CD16A) o el receptor de FcγRIIIB (CD16B), y, con mayor preferencia, el receptor de FcγRIII es el receptor de FcγRIIIA (CD16A). En otro aspecto preferido, el receptor de FcγRII es el receptor de FcγRIIA (CD32A) o el receptor de FcγRIIB (CD32B), y con mayor preferencia el receptor de FcγRIIB (CD32B). En un aspecto de particular preferencia, un sitio de unión del diacuerpo es específico para CD32B y el otro sitio de unión es específico para CD16A. En una realización específica de la invención, por lo menos un sitio de unión al epítope del diacuerpo o molécula del diacuerpo es específico para an activating Fc receptor y por lo menos un sitio distinto es específico para un receptor de Fc de inhibición. En ciertos aspectos de esta realización el receptor de Fc de activación es CD32A y el receptor de Fc de inhibición es CD32B. En otros aspectos de esta realización el receptor de Fc de activación es BCR y el receptor de Fc de inhibición es CD32B. Incluso en otros aspectos de esta realización, el receptor de Fc de activación is IgERI y el receptor de Fc de inhibición es CD32B.

[0043] En casos en los cuales un sitio de unión al epítope es específico para CD16A, los dominios VL y VH pueden ser iguales que o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón 3G8, cuya secuencia se ha clonado y se indica en este documento. En otros casos en los cuales un sitio de unión al epítope es específico para CD32A, los dominios VL y VH pueden ser iguales que o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón IV,3. Incluso en otros casos en los que un sitio de unión al epítope es específico para CD32B, los dominios VL y VH pueden ser iguales que o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón 2B6, cuya secuencia se ha clonado y se indica en este documento. Se debe entender que cualquiera de los dominios VL o VH de los anticuerpos 3G8, 2B6 e IV.3 pueden usarse en cualquier combinación. La presente invención también se refiere a un diacuerpo biespecífico o molécula del diacuerpo en donde el primer epítope es específico para CD32B, y el segundo epítope es específico para CD16A.

[0044] En otros aspectos, un sitio que se une al epítope puede ser específico para un antígeno patogénico. Como se usa en este documento, un antígeno patogénico es un antígeno involucrado en una enfermedad patogénica específica, que incluyen cáncer, infección o enfermedad autoinmune. De este modo, el antígeno patogénico puede ser un antígeno de tumor, un antígeno bacteriano, un antígeno viral, o un antígeno autoinmune. Los antígenos patogénicos ejemplificativos incluyen, aunque no se limitan a, lipopolisacárido, antígenos virales seleccionados del grupo que consiste en antígenos virales del virus de inmunodeficiencia humana, Adenovirus, Virus Sincitial Respiratorio, Virus del Nilo Occidental (por ej., antígenos E16 y/o E53) y virus de la hepatitis, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y colágeno. Con preferencia, el antígeno patogénico es un antígeno neutralizante. En

un aspecto preferido, donde un sitio de unión al epítope es específico para CD16A o CD32A, el otro sitio que se une al epítope es específico para un antígeno patogénico sin incluir los antígenos autoinmunes. Incluso en otro aspecto preferido, donde un sitio de unión al epítope es específico para CD32B, el otro sitio que se une al epítope es específico para cualquier antígeno patogénico. En realizaciones específicas, el diacuerpo molecule de la invención se une a dos antígenos diferentes en la misma célula, por ejemplo, un sitio que se une al antígeno es específico para un receptor de Fc de activación mientras que el otro es específico para un receptor de Fc de inhibición. En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo se une dos epítopes neutralizantes virales distintos, por ejemplo, aunque sin limitarse a, E16 y E53 del Virus del Nilo Occidental.

[0045] Incluso en otra realización de la presente invención, los diacuerpos de la invención pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades y trastornos. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un diacuerpo covalente o molécula del diacuerpo de la invención en la cual por lo menos un sitio de unión es específico para un antígeno patogénico, tales como un antígeno expresado sobre la superficie de una célula cancerosa o sobre la superficie de una bacteria o virión y por lo menos un sitio de unión distinto es específico para un receptor de Fc, *por ej.*, CD16A.

[0046] Incluso en otra realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un diacuerpo o molécula del diacuerpo de la invención, en la cual por lo menos un sitio de unión es específico para CD32B y por lo menos un sitio de unión distinto es específico para CD16A.

[0047] Incluso en otra realización, la invención se refiere a un método para inducir la tolerancia inmunológica a un antígeno patogénico que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un diacuerpo covalente o molécula del diacuerpo dovalente de la invención, en la cual por lo menos un sitio de unión es específico para CD32B y por lo menos un sitio de unión distinto es específico para dicho antígeno patogénico. En aspectos de esta realización, el antígeno patogénico puede ser un alergeno u otra molécula para la cual se desea tolerancia inmunológica, tales como una proteína expresada sobre tejido transplantado.

[0048] Incluso en otra realización, la presente invención se refiere a un método para destoxificación que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un diacuerpo covalente o molécula del diacuerpo de la invención, en la cual por lo menos un sitio de unión es específico para un marcador de la superficie celular y por lo menos un sitio de unión distinto es específico para una toxina. En aspectos particulares, el diacuerpo de la invención administrado es aquel donde un sitio de unión es específico para un marcador de la superficie celular tales como un Fc y el otro sitio de unión es específico para una toxina

bacteriana o para un fármaco. En un aspecto, el marcador de la superficie celular no se encuentra en los glóbulos rojos.

[0049] La presente invención en forma adicional se refiere a un método para aumentar la vida media de una molécula que comprende un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, en donde el método comprende ligar (*por ej.*, directa o indirectamente por medio de conjugación, o por unión, *etc*.), dos o más dominios que se unen a la albúmina a la molécula. La invención se refiere en particular a la realización de dicho método en donde la ligación de dos o más dominios que se unen a la albúmina comprende ligar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dominios que se unen a la albúmina a la molécula, y más particularmente se refiere a la realización de dicho método en donde la ligación de dos o más dominios que se unen a la albúmina comprende ligar 2 dominios que se unen a la albúmina a la molécula. Dichos dos o más dominios que se unen a la albúmina pueden ser iguales o diferentes y pueden seleccionarse en forma independiente con preferencia del grupo que consiste en la secuencia de la SEC ID NRO.: 304, SEC ID NRO.: 323, SEC ID NRO.: 324, SEC ID NRO.: 325, SEC ID NRO.: 326, SEC ID NRO.: 327, SEC ID NRO.: 328, o SEC ID NRO.: 329. La invención se refiere en particular a la realización de dichos métodos en donde los dos o más dominios que se unen a la albúmina son iguales o en donde 2 de los dominios que se unen a la albúmina son iguales. La invención se refiere en particular a la realización de dicho método en donde the molecule que comprende un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es un diacuerpo.

3.1 DEFINICIONES

[0050] Salvo que se defina de otro modo, todos los terminus de arte, anotaciones y otros términos y terminología científica usados aquí pretenden tener los significados comúnmente entendidos por aquellas personas con experiencia en la materia a la cual pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en este documento para generar claridad y/o para una amplia referencia, y la inclusión de dichas definiciones en este documento no necesariamente deben construirse para representar una diferencia sustancial por sobre lo que generalmente se entiende en la materia. La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen tecnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, e inmunología, que se encuentran dentro de la habilidad en la materia. Dichas técnicas se explican en detalle en la bibliografía, tales como, Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1999, que incluyen supplements through 2001); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, que incluyen supplements through 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Métodos

of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert, y N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; y Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000).

[0051] Como se usa en este documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camELISAdos, Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs biespecíficos con unión de disulfuro (sdFv), intracuerpos, y anticuerpos anti-idiotípicos (que incluyen, *por ej.*, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id a anticuerpos de la invención), y los fragmentos que se unen a los epítopes de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen las moléculas de inmunoglobulina y los fragmentos inmunológicamente activos de las moléculas de inmunoglobulina, *es decir*, moléculas que contienen un sitio que se une al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (*por ej.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), class (*por ej.*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 and IgA_2) o subclase.

[0052] Como se usa en este documento, los términos "se une en forma inmunoespecífica," "reconoce en forma inmunoespecífica," "se une en forma específica," "reconoce en forma específica" y términos análogos se refieren a moléculas que se unen en forma específica a un antígeno (*por ej.*, epítope o complejo inmune) y no se unen en forma específica a otra molécula. Una molécula que se une en forma específica a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según se determina por, *por ej.*, inmunoensayos, BIAcore, o otros ensayos conocidos en la materia. Con preferencia, las moléculas que se unen en forma específica a un antígeno no reaccionan en forma cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen en forma específica a un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore, u otras técnicas conocidas para aquellas personas con experiencia en la materia.

[0053] Como se usa en este documento, "complejo inmune" se refiere a una estructura que se forma cuando por lo menos una molécula de destino y por lo menos un polipéptido que contiene región Fcγ heteróloga se unen entre sí, formando un complejo de peso molecular más grande. Algunos ejemplos de complejos inmunes son complejos de antígeno-anticuerpo que pueden ser en forma indistinta solubles o en partículas (*por ej.*, un complejo antígeno/anticuerpo sobre una superficie celular.).

[0054] Como se usa en este documento, los términos "cadena pesada," "cadena liviana," "región variable," "región de marco," "dominio constante," y similares, tienen su significado normal en la materia de la inmunología y se refieren a dominios en inmunoglobulinas que ocurren naturalmente y los dominios correspondientes de proteínas de unión sintética (por ej.,

recombinante) (*por ej.*, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de inmunoglobulinas que ocurren naturalmente (*por ej.*, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas, usualmente expresadas como una glicoproteína de alrededor de 150.000 Da. La porción amino terminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 hasta 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de los antígenos. La porción carboxi-terminal ("C") de cada cadena define una región constante, con cadenas livianas que tienen una constante de dominio simple y cadenas pesadas usualmente tienen tres constantes de dominio y región de bisagra. De este modo, la estructura de las cadenas livianas de una molécula de IgG es n-V_L-C_L-c y la estructura de cadenas pesadas de IgG es n-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-c (donde H es la región de bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), que contienen los residuos en contacto con antígeno y segmentos que no son CDR, denominados como segmentos de marco, que en general mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los bucles de CDR (aunque ciertos residuos de marco también pueden contactar el antígeno). De este modo, los dominios VL y VH tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c. .

[0055] Cuando se hace referencia a la unión de proteínas o anticuerpos (como se define en este documento en sentido amplio), la asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991). Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas livianas y pesadas maduras de inmunoglobulinas se designan por medio de la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identificó una secuencia de aminoácidos de consenso para cada sub-grupo, y asignó un número de residuo a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat es extendible a anticuerpos no incluidos en su compendio por medio de la alineación del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat con referencia a aminoácidos conservados. Este método para la asignación de números de residuos se ha tornado estándar en el campo e identifica ampliamente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, que incluyen variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena liviana humana de anticuerpo ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena liviana de anticuerpo de ratón.

[0056] Como se usa en este documento, el término "cadena pesada" se usa para definir la cadena pesada de un anticuerpo de IgG. En una IgG nativa, intacta, la cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, hinge, CH2 y CH3. En toda la presente solicitud, la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public

Health Service, NH1, MD (1991), incorporadas expresamente en este documento a modo de referencias. El “índice de EU como Kabat” se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humano. Algunos ejemplos de las secuencias de aminoácidos que contienen la bisagra de IgG1 humana, dominios CH2 y CH3 se muestran en las **FIGS. 1A y 1B** como se describe, más abajo. Las **FIGS. 1A y 1B** establecen además secuencias de aminoácidos de la bisagra, dominios CH2 y CH3 de las cadenas pesadas de IgG2, IgG3 y IgG4. Las secuencias de aminoácidos de los isotipos IgG2, IgG3 y IgG4 están alineados con la secuencia de IgG1 por colocación del primero y el último residuos de cisteína de las respectivas regiones de bisagra, que forman las uniones entre cadenas pesadas S-S, en las mismas posiciones. Para la región de bisagra de IgG2 e IgG3, no todos los residuos esán numerados por el índice EU.

[0057] La “región de bisagra” o “dominio de bisagra” se define en general como que se estira de Glu216 a Pro230 de IgG1 humana. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región de bisagra de IgG1 humana se muestra en la **FIG. 1A** (residuos de aminoácidos en la **FIG. 1A** se numeran de acuerdo con el sistema Kabat). Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia IgG1 colocando the primero y último residuos de cisteína formando una unión S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones como se muestra en la **FIG. 1A**.

[0058] Como se usa en este documento, el término “región de Fc,” “dominio de Fc” o términos análogos se usan para definir una región de extremo terminal C de una cadena pesada de IgG. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos que contiene la IgG1 humana se muestra en la **FIG. 1B**. Aunque los límites pueden variar levemente, según la numeración de acuerdo con el sistema Kabat, el dominio Fc se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447 (los residuos de aminoácidos en la **FIG. 1B** se numeran de acuerdo con el sistema Kabat). La **FIG. 1B** también proporciona algunos ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las Regiones Fc de los isotipos IgG IgG2, IgG3, y IgG4.

[0059] La región Fc de una IgG comprende dos dominio constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana usualmente se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 341 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat **(FIG. 1B)**. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana usualmente se extiende desde los aminoácidos 342 hasta 447 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat **(FIG. 1B)**. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (también denominado como dominio “Cγ2”) es único en el sentido que no se empareja de cerca con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificadas ligadas por N se interponen entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

[0060] Como se usa en este documento los términos “proteína que se une a FcγR,” “anticuerpo FcγR,” y “anticuerpo anti-FcγR”, se usan en forma indistinta y se refieren a una variedad de proteínas con aspecto de inmunoglobulina o derivadas de inmunoglobulina. Las “proteínas que se unen a FcγR” se unen a FcγR por medio de una interacción con dominios

V_L y/o V_H (como distinción de la unión mediada por Fcγ). Algunos ejemplos de las proteínas que se unen a FcγR incluyen anticuerpos humanizados y quiméricos, policlonales, completamente humanos (*por ej.*, que comprenden 2 cadenas pesadas y 2 cadenas livianas), fragmentos de los anteriores (*por ej.*, Fab, Fab', $F(ab')_2$, y fragmentos Fv), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales (véase, *por ej.*, Lanzavecchia *et al.* (1987) *"The Use Of Hybrid Hybridomas To Target Human Cytotoxic T Lymphocytes,"* Eur. J. Immunol. 17:105-111), anticuerpos de cadena simple (véase, *por ej.*, Bird *et al.* (1988) *"Single-Chain Antigen-Binding Proteínas,"* Science 242:423-26), proteínas de fusión (*por ej.*, proteínas de fusión de visualización de fago), "minicuerpos" (véase, *por ej.*, Patente de los EE UU Nro. 5,837,821) y otras proteínas que se unen a los antígenos que comprenden un dominio V_L y/o V_H o fragmento de los anteriores. En un aspecto, la proteína que se une a FcγRIIIA es un "anticuerpo tetramérico" *es decir*, que en general tiene la estructura de una IgG que ocurre en la naturaleza y que comprende dominios variables y constantes, *es decir*, dos cadenas livianas que comprende un dominio V_L y un dominio constante de cadena liviana y dos cadenas pesadas que comprende un dominio V_H y dominios constantes y de bisagra de cadena pesada.

[0061] Como se usa en este documento el término "antagonistas de FcγR" y términos análogos se refieren a sustancias de proteínas y no proteináceas, que incluyen moléculas pequeñas que antagonizan por lo menos una actividad biológica de un FcγR, por ej., señalización en bloque. Por ejemplo, las moléculas de la invención señalización en bloque mediante el bloqueo de la unión de IgGs a un FcγR.

[0062] Como se usa en este documento, el término "derivado" en el contexto de polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado por la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones a los residuos de aminoácidos. El término "derivado" como se usa en este documento se refiere, además, a un polipéptido o proteína que se ha modificado, *es decir*, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o la proteína. Por ejemplo, aunque no a modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, *por ej.*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por medio de grupos protectores/ de bloqueo conocidos, descomposición proteolítica, ligadura a un antígeno celular u otra proteína, *etc.* Un polipéptido o una proteína derivada puede producirse por medio de modificaciones químicas con el uso de técnicas conocidas para aquellas personas con experiencia en la materia, que incluyen, aunque sin limitarse a descomposición química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, *etc.* Además, un polipéptido o una proteína derivada derivado posee una función idéntica o similar al polipéptido o la proteína de la cual derivó.

[0063] Como se usa en este documento, el término "derivado" en el contexto de un derivado no proteináceo se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma en base a la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula

orgánica incluye, pero no se limita a, una molécula modificada, *por ej.*, por medio de la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carbonilo o amina. Una molécula orgánica también puede ser esterificada, alquilada y/o fosforilada.

[0064] Como se usa en este documento, el término “molécula del diacuerpo” se refiere a un complejo de dos o más cadenas de polipéptidos o proteínas, donde cada una comprende por lo menos un dominio VL y uno VH o fragmento de los anteriores, en donde ambos dominios están comprendidos dentro de una cadena de polipéptido simple. En ciertas realizaciones “molécula del diacuerpo” incluye moléculas que comprenden un Fc o un dominio Fc-bisagra. Dichas cadenas de polipéptidos en el complejo pueden ser iguales o diferentes, *es decir*, la molécula de diacuerpo puede ser un homo-multímero o un hétero-multímero. En aspectos específicos, “molécula del diacuerpo” incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas de polipéptidos que contienen ambos, un dominio VL y uno VH. Las cadenas de polipéptidos individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden unirse en forma covalente a por lo menos un polipéptido distinto del multímero por uniones de disulfuro entre cadenas.

[0065] Como se usa en este documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan en forma indistinta para referirse a una afección en un sujeto. En particular, el término “enfermedad autoinmune” se usa en forma indistinta con el término “trastorno autoinmune” para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por lesión celular, a tejido y/u órgano causada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término “enfermedad inflamatoria” se usa en forma indistinta con el término “trastorno inflamatorio” para referirse a una afección en un sujeto caracterizado por inflamación, con preferencia inflamación crónica. Los trastornos autoinmunes pueden o no estar asociados con inflamación. Más aún, la inflamación puede o no ser causada por un trastorno autoinmune. De este modo, ciertos trastornos pueden caracterizarse como ambos trastornos inflamatorios y autoinmunes.

[0066] “Cadenas de polipéptidos idénticas” como se usa en este documento se refiere, además, a cadenas de polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos casi idénticas, por ejemplo, que incluyen cadenas que tienen una o más diferencias de aminoácidos, con preferencia sustituciones de aminoácidos conservadores, de manera tal que la actividad de las dos cadenas de polipéptidos no es significativamente diferente.

[0067] Como se usa en este documento, el término “cáncer” se refiere a un neoplasma o tumor que resulta del crecimiento no controlado anormal de las células. Como se usa en este documento, cáncer incluye en forma explícita, leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y ha destruido estructuras corporales vecinas y se esparció a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con un antígeno específico del cáncer.

[0068] Como se usa en este documento, el término “agente modulador inmunológico” y sus variaciones se refieren a un agente que modula el sistema inmunológico de un huésped. En ciertas realizaciones, un agente modulador inmunológico es un agente inmunosupresor. En ciertas otras realizaciones, un agente modulador inmunológico es es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, aunque no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos, y moléculas orgánicas.

[0069] Como se usa en este documento, el término “epítope” se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula de proteínas que tiene actividad inmunogénica o antigénica en un animal, con preferencia en un mamífero, y con mayor preferencia en un humano. Un epítope que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que genera una respueta al anticuerpo en un animal. Un epítope que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al cual un anticuerpo se une en forma inmunoespecífica según se determina por cualquier método muy conocido para una persona con experiencia en la materia, por ejemplo por inmunoensayos. Los epítopes antigénicos no necesariamente tienen que ser inmunogénicos.

[0070] Como se usa en este documento, el término “fragmento” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 60 residuos de amino contiguos, por lo menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos contiguous 80 residuos de aminoácidos, por lo menos contiguous 90 residuos de aminoácidos, por lo menos contiguous 100 residuos de aminoácidos, por lo menos contiguous 125 residuos de aminoácidos, por lo menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos contiguous 175 residuos de aminoácidos, por lo menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o por lo menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido mantiene por lo menos una función del polipéptido.

[0071] Como se usa en este documento, los términos “ácidos nucleicos” y “secuencias de nucleótidos” incluyen moléculas de ADN (*por ej.*, cDNA o ADN genómico), moléculas de ARN (*por ej.*, mRNA), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse con el uso de, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, aunque no se limitan a, bases inosina o tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender DNA o moléculas de ARN que comprenden cadenas principales modificadas que prestan atributos beneficiosos a la moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a la nucleasa o un aumento en la capacidad de

cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser de hebra simple, de doble hebra, pueden contener ambas porciones de hebra simple o de hebra doble, y pueden contener porciones de hebra triple, pero con preferencia es ADN de doble hebra.

[0072] Como se usa en este documento, una “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a esa cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o manejar una enfermedad o un trastorno. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para demorar o minimizar el inicio de la enfermedad, *por ej.*, demorar o minimizar la diseminación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente efectiva con respecto a un agente terapéutico de la invención se refiere a la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otros tratamientos, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad.

[0073] Como se usa en este documento, los términos “agente profiláctico” y “agente agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente que puede usarse en la prevención de un trastorno o prevención de recurrencia o diseminación de un trastorno. Una cantidad efectiva como profilaxis puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la recurrencia o diseminación de enfermedad hiper-proliferativa, en particular el cáncer, o la ocurrencia de la misma en un paciente, que incluyen aunque sin limitarse a aquellos predisupuestos a la enfermedad hiper-proliferativa, por ejemplo aquellos predispuestos genéticamente al cáncer o aquellos previamente expuestos a los carcinógenos. Una cantidad efectiva como profilaxis también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. Además, una cantidad efectiva como profilaxis con respecto a un agente profiláctico de la invención significa esa cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad.

[0074] Como se usa en este documento, los términos “previene”, “prevenir” y “prevención” se refieren a la prevención de la recurrencia o el inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

[0075] Como se usa en este documento, el término “en combinación” se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso del término término “en combinación” no restringe el orden en la cual se administran agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (*por ej.*, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), en forma concomitante con, o posterior a (*por ej.*, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6

horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

[0076] "Función efectora" como se usa en este documento se refiere a un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región del anticuerpo Fc con un receptor de Fc o un antígeno. Las funciones efectoras incluyen aunque no se limitan a citotoxicidad mediada por células dependientes de los anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediadas por células que dependen de los anticuerpos (ADCP), y citotixicidad que depende de los complementos (CDC). Las funciones efectoras incluyen tanto aquellas que operan despues de la unión de un antígeno y aquellas que operan independientes de la unón al antígeno.

[0077] "Célula efectora" como se usa en este documento se refiere a una célula del sistema inmunológico que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más de las funciones efectoras. Las células efectoras incluyen aunque no se limitan a monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulados grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK), y pueden ser de cualquier organismo que incluyen aunque sin limitarse a humanos, ratones, ratas, conejos, y monos.

[0078] Como se usa en este documento, el término "se une en forma específica a un complejo inmune" y términos análogos se refieren a moléculas que se unen en forma específica a un complejo inmune y no se unen en forma específica a otra molécula. Una molécula que se une en forma específica a un complejo inmune puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según se determina por, *por ej.*, inmunoensayos, BIAcore, o otros ensayos conocidos en la materia. Con preferencia, las moléculas que se unen en forma específica a un complejo inmune no reaccionan en forma cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen en forma específica a un complejo inmune pueden identificarse, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore, u otras técnicas conocidas para aquellas personas con experiencia en la materia.

[0079] Una "proteína de fusión estable" como se usa en este documento se refiere a una proteína de fusión que sufre un nivel mínimo a no detectable de degradación durante la producción y/o el almacenamiento según se evalúa con el uso de ensayos funcionales y bioquímicos comunes conocidos por los expertos en el arte, y pueden almacenarse durante un período prolongado de tiempo con sin pérdida de actividad biológica, *por ej.*, unión a FcγR.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGS. 1 A-B SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE BISAGRA DE CH1 DE IgG HUMANA Y REGIONES DE Fc

[0080] La **Figura 1(A) y (B)** proveen las secuencias de aminoácidos de IgG1 humana, Bisagra IgG2, IgG3 y IgG4 (A) y dominios Fc (B). (Dominio de bisagra IgG1 **(SEC ID NRO.: 1)**; dominio de bisagra IgG2 **(SEC ID NRO.: 2)**; dominio de bisagra IgG3 **(SEC ID**

NRO.: 3); dominio de bisagra IgG4 **(SEC ID NRO.: 4)**; dominio IgG1 Fc **(SEC ID NRO.: 5)**; dominio IgG2 Fc **(SEC ID NRO.: 6)**; dominio IgG3 Fc **(SEC ID NRO.: 7)**; dominio IgG1 Fc **(SEC ID NRO.: 8)**). Los residuos de aminoácidos que se muestran en las FIGS. 1A y 1B se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat EU. Las secuencias de isotipos están alineadas con la secuencia IgG1 colocando el primero y último residuos de cisteína de las respectivas regiones de bisagra, que forman las uniones S-S inter-cadena pesada, en las mismas posiciones. Para la **Figura 1B**, los residuos en el dominio CH2 se indican por +, mientras que los residuos en el dominio CH3 se indican por ~.

FIG. 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE CADENAS DE POLIPÉPTIDOS DE DIACUERPOS BIFUNCIONALES COVALENTES

[0081] Los polipéptidos de diacuerpo bifuncional, covalente consisten en un anticuerpo VL y un dominio de anticuerpo VH separado por una ligadura de péptido corta. La nigadura de residuo de 8 aminoácidos evita el auto montaje de una cadena de polipéptido simple en construcciones scFv, y, en su lugar, interacciones entre los dominios VL y VH de diferentes cadenas de polipéptidos predominan. Se crearon 4 construcciones (cada construcción se describe a partir del término amino (“n”), el lado izquierdo de la construcción, hacia el término carboxi (“c”), lado derecho de la figura): la construcción (1) **(SEC ID NRO.: 9)** comprendía, ligadura del dominio de n-VL (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia de extremo terminal C (LGGC)-c; la construcción (2) **(SEC ID NRO.: 11)** comprendía el dominio de n-VL Hu3G8 - ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia de extremo terminal C (LGGC)-c; la construcción (3) (**SEC ID NRO.: 12**) comprendía el dominio de n-VL Hu3G8 - ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia de extremo terminal C (LGGC)-c; la construcción (4) **(SEC ID NRO.: 13)** comprendía ligadura del dominio de n-VL (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia de extremo terminal C (LGGC)-c.

FIG. 3 ANÁLISIS POR SDS-PAGE DE DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

[0082] Los diacuerpos purificados por afinidad se sometieron a análisis por SDS-PAGE en condiciones de reducción (hileras 1-3) y sin reducción (hileras 4-6). Los pesos moleculares aproximados del estándar (entre hileras 3 y 4) son los que se indican. Hileras 1 y 4, h3G8 CMD; Hileras 2 y 5, h2B6 CMD; y Hileras 3 y 6, h2B6-h3G8 CBD.

FIGS. 4 A-B ANÁLISIS SEC DE DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

[0083] Los diacuerpos purificados por afinidad se sometieron a análisis SEC. **(A)** Perfil de elución de estándares desconocidos: IgG de longitud completa (~150 kDa), fragmento Fab de IgG (~50 kDa), y scFv (~30 kDa); **(B)** Perfil de elución de h2b6 CMD, h3G8 CMD, y h2B6-h3G8 CBD.

FIG. 5 UNIÓN DE h2B6-h3G8 CBD A sCD32B Y sCD16A

[0084] La unión de h2B6-h3G8 CBD a sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA sándwich. Se usó sCD32B como proteína blanco. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con HRP. h3G8 CMD, que se une CD16A, se usó como control.

FIGS. 6 A-C ANÁLISIS BIACORE DE LA UNIÓN DEL DIACUERPO A sCD16A, sCD32B Y sCD32B

[0085] La unión de h2B6-h3G8 CBD, h2B6 CMD y h3G8 CMD a sCD16A, sCD32B, y sCD32A (control negativo) se analizó por análisis SPR. h3G8 scFv también se evaluó como control. **(A)** Unión a sCD16; **(B)** Unión a sCD32B and **(C)** Unión a sCD32A. Se inyectaron los diacuerpos a una concentración de 100 NM, y scFv a una concentración de 200 nM, sobre las superficies receptoras en un índice de flujo de 50 ml/min durante 60 seg.

FIGS. 7 A-C ANÁLISIS BIACORE DE LA UNIÓN DEL DIACUERPO A sCD16A Y sCD32B

[0086] La unión de h2B6-h3G8 CBD, h2B6 CMD y h3G8 CMD a sCD16A, y sCD32B se analizó por análisis SPR. h3G8 scFv también se evaluó como control. **(A)** Unión a h3G8 CMD sCD16A; **(B)** Unión de h2B6-h3G8 CBD a sCD16A; **(C)** Unión de h3G8 scFv a sCD16A; **(D)** Unión de h2B6 CMD to sCD32B; y **(E)** Unión de h2B6-h3G8 CBD a sCD32B. Se inyectaron los diacuerpos a concentraciones de 6,25-200 nM sobre las superficies receptoras en un índice de flujo de 70 ml/min durante 180 seg.

FIG. 8 ESQUEMA QUE MUESTRA LA INTERACCIÓN DE CADENAS DE POLIPÉPTIDOS QUE COMPRENDEN LOS DOMINIOS VL y VH PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO BIESPECÍFICO COVALENTE

[0087] NH_2 y COOH represent el término amino y el término carboxi, respectivamente de cada cadena de polipéptidos. S representa el residuo de cisteína de extremo terminal C en cada cadena de polipéptido. VL y VH indican el dominio liviano variable y doinio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas e intermitentes son para distinguir entre las dos cadenas de polipéptidos y, en particular, representan las porciones de ligadura de dichas cadenas. h2B6 Fv y h3G8 Fv indican un sitio que se une al epítope específica para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 9 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE CADENAS DE POLIPÉPTIDOS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

[0088] Representación de construcciones de polipéptidos de las moléculas de diacuerpo de la invención (cada construcción se describe a partir del término amino (“n”), el lado izquierdo de la construcción, hacia el término carboxi (“c”), lado derecho de la figura). La construcción (5) **(SEC ID NRO.: 14)** comprendía, n-VL dominio Hu2B6 - una primera ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu3G8 - a segunda ligadura

(LGGC)- and a de extremo terminal C Fc dominio de IgG1 humana-c; la construcción (6) **(SEC ID NRO.: 15)** comprendía el dominio de n-VL Hu3G8 - ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu2B6 - y segunda ligadura (LGGC)- y un dominio Fc de extremo terminal C de IgG1 humana-c; la construcción (7) **(SEC ID NRO.: 16)** comprendía el dominio de n-VL Hu2B6 - una primera ligadura (GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia de extremo terminal C (LGGCFNRGEC) (**SEC ID NRO.: 17**)-c; la construcción (8) **(SEC ID NRO.: 18)** comprendía el dominio de n-VL Hu3G8 - ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu2B6 - y segunda ligadura (LGGC)- y un dominio Fc/bisagra de extremo terminal C de IgG1 humana (con sustitución de aminoácidos A215V)-c.

FIG,10 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDE DOMINIOS Fc A sCD32B Y sCD16A

[0089] La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA sándwich. Los diacuerpos analizados se produjeron por 3 sistemas de expresión recombinantes: co-transfección de pMGX669 y pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; co-transfección de pMGX667 y pMGX676, que expresan las construcciones 2 y 5, respectivamente; y co-transfección de pMGX674 y pMGX676, que expresan las construcciones 5 y 6, respectivamente. Se usó sCD32B como proteína blanco. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con HRP.

FIG. 11 ESQUEMA QUE MUESTRA LA INTERACCIÓN DE DOS CADENAS DE POLIPÉPTIDOS DONDE CADA UNA COMPRENDE UN DOMINIO Fc PARA FORMAR UN DIACUERPO COVALENTE, BIVALENTE

[0090] NH_2 y COOH representan el término amino y el término carboxi, respectivamente de cada cadena de polipéptidos. S representa el por lo menos un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína en la segunda secuencia de unión de cada cadena de polipéptidos. VL y VH indican el dominio liviano variable y doinio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas e intermitentes son para distinguir entre las dos cadenas de polipéptidos y, en particular, representan las primeras porciones de ligadura de dichas cadenas. CH2 y CH3 representan los dominos constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. h2B6 Fv y h3G8 Fv indican un sitio que se une al epítope específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG,12 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS BISAGRA/Fc PARA sCD32B Y sCD16A

[0091] La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc para sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA sándwich. Los diacuerpos analizados se produjeron por 4 sistemas de expresión recombinantes: co-transfección de pMGX669 + pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; co-transfección de pMGX669 + pMGX678, que expresan las construcciones 2 y 8, respectivamente; co-transfección de

pMGX677 + pMGX674, que expresan las construcciones 7 y 6, respectivamente; y co-transfección de pMGX677 + pMGX678, que expresan las construcciones 7 y 8, respectivamente. Se usó sCD32B como proteína blanco. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con HRP.

FIG. 13 ESQUEMA QUE MUESTRA LA INTERACCIÓN DE CADENAS DE POLIPÉPTIDOS PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO TETRAMÉRICO

[0092] NH_2 y COOH representan el término amino y el término carboxi, respectivamente de cada cadena de polipéptidos. S representa el por lo menos un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína en la segunda secuencia de unión que lleva Fc, cadena de polipéptido "más pesada" y un residuo de cisteína en la secuencia de extremo terminal C de la cadena de polipéptidos "más liviana", que no lleva Fc. VL y VH indican el dominio liviano variable y doinio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas e intermitentes son para distinguir entre cadenas de polipéptidos y, en particular, representan las primeras porciones de ligadura de cadenas más pesadas o la ligadura de dichas cadenas más livianas. CH2 y CH3 representan los dominos constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. h2B6 Fv y h3G8 Fv indican un sitio que se une al epítope específico para CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 14 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE CADENAS DE POLIPÉPTIDOS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc QUE FORMAN DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

[0093] Representación de construcciones de polipéptidos which form las moléculas de diacuerpo de la invención (cada construcción se describe a partir del término amino ("n"), el lado izquierdo de la construcción, hacia el término carboxi ("c"), lado derecho de la figura). La construcción (9) (SEC ID NRO.: 19) comprendía un dominio n-bisagra/Fc de IgG1 humana - el dominio VL Hu3G8 - ligadura (GGGSGGGG (SEC ID NRO.: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - ligadura (GGGSGGGG (SEC ID NRO.: 10))- y una secuencia LGGC de extremo terminal C-c; la construcción (10) (SEC ID NRO.: 20) comprendía n-un dominio Fc de IgG1 humana - el dominio VL Hu3G8 - ligadura (GGGSGGGG (SEC ID NRO.: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - ligadura (GGGSGGGG (SEC ID NRO.: 10))- and una secuencia LGGC de extremo terminal C-c; la construcción (11) (SEC ID NRO.: 21) comprendía el dominio de n-VL Hu2B6 (G105C) - ligadura (GGGSGGGG (SEC ID NRO.: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y un dominio Fc/bisagra de extremo terminal C de IgG1 humana con sustitución de aminoácidos A215V-c; la construcción (12) (SEC ID NRO.: 22) comprendía el dominio de n-VL Hu3G8 - ligadura (GGGSGGGG (SEC ID NRO.: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 (G44C) - y una secuencia FNRGEC de extremo terminal C (SEC ID NRO.: 23)-c.

FIG. 15 A-B ANÁLISIS SDS-PAGE Y TRANSFERENCIA WESTERN DE DIACUERPOS TETRAMÉRICOS POR AFINIDAD

[0094] Los diacuerpos producidos por sistemas de expresión recombinantes co-transfectados con vectores que expresan las construcciones 10 y 1, construcciones 9 y 1, y construcciones 11 y 12 se sometieron a análisis por SDS-PAGE en condicciones no reducidas **(A)** y análisis de Transferencia Western con el uso de IgG1 H+L anti humana de cabra como sonda **(B)**. Las proteínas en el gel de SDS-PAGEl se visualizaron con Simply Blue Safestain (Invitrogen). Para ambos paneles A y B, las moléculas de diacuerpo que comprenden construcciones 10 y 1, construcciones 9 y 1, y construcciones 11 y 12A se encuentran en las hileras 1, 2 y 3, respectivamente.

FIG,16 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc Y UNIONES DE DISULFURO ENTRE CADENAS DISEÑADOS ESPECIALMENTE PARA sCD32B Y sCD16A

[0095] La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc y uniones de disulfuro diseñadas específicamente entre las cadenas de polipéptidos más “livianas” y “pesadas” para sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA sándwich. Los diacuerpos analizados se produjeron por 3 sistemas de expresión recombinantes: que expresan las construcciones 1 y 10, que expresan las construcciones 1 y 9, y que expresan las construcciones 11 y 12, respectivamente. Se usó sCD32B como proteína blanco. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con HRP. Unión de h3G8 se usó como control.

FIG. 17 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE PRECURSOR DE POLIPROTEÍNAS DE LA MOLÉCULA DEL DIACUERPO Y REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE CADENAS DE POLIPÉPTIDOS QUE CONTIENEN CADENA LIVIANA LAMBDA Y/O DOMINIOS DE BISAGRA

[0096] Representación de construcciones de polipéptidos que compreden las moléculas de diacuerpo de la invención (cada construcción se describe a partir del término amino (“n”), el lado izquierdo de la construcción, hacia el término carboxi (“c”), lado derecho de la figura). La construcción (13) **(SEC ID NRO.: 95)** comprendía, n-VL dominio 3G8 - una primera ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de 2,4G2VH - una segunda ligadura (LGGC)- sitio de reconocimiento de furina (RAKR (**SEC ID NRO.: 93**))-dominio VL de 2,4G2- una tercera ligadura (GGGSGGG **(SEC ID NRO.: 10)**-dominio VH de 3G8- y un dominio LGGC de extremo terminal C; (secuencia de nucleósido que codifica **SEC ID NRO.: 95** se proporciona en **SEC ID NRO.: 96**). La construcción (14) **(SEC ID NRO.: 97)** comprendía, n-VL dominio 3G8 - una primera ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de 2,4G2VH - una segunda ligadura (LGGC)- sitio de reconocimiento de furina (RAKR **(SEC ID NRO.: 93)**)-Sitio FMD (Proteasa del Virus de la Enfermedad de Pies y Boca C3)-dominio VL de 2,4G2- una tercera ligadura (GGGSGGG **(SEC ID NRO.: 10)**-

dominio VH de 3G8- y un dominio LGGC de extremo terminal C; (secuencia de nucleósido que codifica **SEC ID NRO.: 97** se proporciona en **SEC ID NRO.: 98**). La construcción (15) **(SEC ID NRO.: 99)** comprendía, n-VL dominio Hu2B6 - una ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu3G8- y un dominio de extremo terminal C FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**; (secuencia de nucleósido que codifica **SEC ID NRO.: 99** se proporciona en la **SEC ID NRO.: 100**). La construcción (16) **(SEC ID NRO.: 101)** comprendía, n-VL dominio Hu3G8 - una ligadura (GGGSGGGG **(SEC ID NRO.: 10)**) - el dominio VH de Hu2B6- y un dominio de extremo terminal C VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**; (secuencia de nucleósido que codifica **SEC ID NRO.: 101** se proporciona en la **SEC ID NRO.: 102**).

FIG. 18 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO DERIVADAS DE UNA MOLÉCULA PRECURSORA DE POLIPROTEÍNAS PARA mCD32B Y sCD16A

[0097] La unión de moléculas de diacuerpo derivadas de la construcción de molécula precursora de poliproteínas 13 **(SEC ID NRO.: 95)** para CD32B de murino (mCD32B) y CD16A soluble (sCD16A) se analizó en un ELISA sándwich. mCD32B se usó como proteína blanco. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con biotina.

FIG,19 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN CADENA LAMBDA Y/O DOMINIOS DE BISAGRA PARA sCD32B Y sCD16A

[0098] La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios derivados del extremo terminal C de la cadena liviana humana lambda y/o el dominio de bisagra de IgG para sCD32B y sCD16A se evaluó y se comparó con el diacuerpo que comprende construcciones 1 y 2 **(FIG. 5)** en un ELISA sándwich. Los diacuerpos analizados se produjeron por por sistema de expresión recombinante que expresan las construcciones 15 y 16 **(SEC ID NRO.: 99** y **SEC ID NRO.: 101**, respectivamente**)**. Se usó sCD32B como proteína blanco. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado con HRP. Las barras con casilleros pequeños representan la combinación de construcción 15/16 mientras que las barras con casilleros grandes representan la combinación de la construcción 1/2.

FIG. 20 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE 2B6/4420 DART UNIDO A CD32B UBICADO EN LA SUPERFICIE DE UNA CÉLULA Y UNA MOLÉCULA CONJUGADA CON FLOURESCEÍNA

[0099] El diagrama muestra la flexibilidad de la rama anti-fluoresceína “adaptadora universal” del DART así como también la posibilidad de sustituir otras especificidades para la rama 2B6. Las regiones V se muestran como casilleros, las ligaduras GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) se muestran como líneas, el enlace de disulfuro se muestra conectando las dos cadenas. Los constituyentes de una cadena se muestran en azul mientras que el otro es de

color rosa. N, término amino; C, término carboxi; FL, fluoresceína, VL, región variable de cadena liviana; VH, región variable de cadena pesada.

FIG. 21 (PANELES A Y B) EL 2B6/4420 DART SE UNE ESPECÍFICAMENTE A MOLÉCULAS CONJUGADAS CON FLUORESCEÍNA Y PUEDEN UNIRSE EN FORMA SIMULTÁNEA A CD32B.

[00100] (A) 2B6/4420 o 2B6/3G8 se unieron a placas para ELISA recubiertas con Proteína FITC-S. La unión y función de la rama 2B6 se detectaron por compromiso de CD32B soluble, seguido de un anticuerpo específico para CD32B y un anticuerpo de detección secundario conjugado con HRP. **(B)** 2B6/4420 o 2B6/3G8 se unieron a placas para ELISA recubiertas con HuIgG o FITC-HuIgG (conjugado con fluoresceína). La unión se detectó por encastre con un suero policlonal específico para 2B6 Fv seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP.

FIG. 22 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE CÉLULAS B PURIFICADAS CON EL USO DE ANTICUERPOS CD79B ANTI-HUMANOS.

[00101] Células B purificadas se activaron con el uso de concentraciones crecientes de anticuerpos CD79b anti-humanos conjugados con FITC, CB3,1-FITC **(A)** o CB3,2-FITC **(B)** y 50 μg/ml de fragmento $F(ab')_2$ de GAM IgG Específico de Fc (eje x). Las células B se activaron en la presencia de PBS (barras blancas) o 5 μg/ml de cualquiera de αFITCαCD32BDART (barras negras) o αCD16αCD32BDART (barras grises). Las reacciones se realizaron por triplicado y se calcularon las desviaciones estándar.

FIG. 23 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE CÉLULAS B PURIFICADAS

[00102] Células B purificadas de un segundo donante sano se activaron como se describe en la **FIG. 22**, **Panel B.** El índice de proliferación se midió en células activadas en la presencia del anticuerpo anti CD79b conjugado con FITC CB3,2-FITC **(A)** y se comparó con el índice de proliferación de células activadas en la presencia del anticuerpo no rotulado CB3.2 **(B)**.

FIG. 24 (Paneles superior e inferior) DEPLECIÓN DE CÉLULAS DE RATÓN IN VIVO EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B CON EL USO DE MGD261

[00103] Ratones mCD32-/- hCD16A+ C57Bl/6, mCD32-/- hCD32B+ C57Bl/6 and mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ C57Bl/6 de la colonia de reproducción MacroGenics se inyectaron IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 con MGD261 (10, 3, 1 o 0,3mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10mg/kg). Se tomaron muestras de sangre en los días -19 (antes del sangrado), 4, 11, 18, 25 y 32 para análisis de FACS. Se registró la salud y la actividad del animal tres veces por semana. **Panel superior**: h2B6-3G8 y WNV mAb; **Panel Inferior**: ratones h2B6-3G8 –hCD16A o –hCD32B y ratones WNV mAb –hCD16A o – hCD32B.

FIG. 25 DEPLECIÓN DE CÉLULAS DE RATÓN IN VIVO EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B CON EL USO DE 2,4G2-3G8 DB

[00104] Ratones mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+ C57Bl/6, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+ de la colonia de reproducción MacroGenics se inyectaron IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 con 2,4G2-3G8 DB (75ug/ratón), o PBS. Se tomaron muestras de sangre en los días -10 (antes del sangrado), 4, 11 y 18 para análisis de FACS. Se registró la salud y la actividad del animal tres veces por semana.

FIG. 26 DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TUMORAL DE MGD261 CON EL USO DE UN MODELO INTRAVENOSO (IV) DE LA LÍNEA CELULAR RAJI DE TUMOR HUMANO

[00105] Ratones de doce-veinte semanas de vida mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- C57Bl/6 de la colonia de reproducción MacroGenics se inyectaron IV at day 0 con $5x10^6$ células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también recibieron tratamiento por vía intraperitoneana (IP) con 250, 25 o 2,5ug de MGD261 o con PBS (control negativo). Los ratones se observaron todos los días y el peso del cuerpo se registró dos veces por semana. Los ratones que desarrollaron parálisis de las patas posteriores se sacrificaron.

FIG. 27 EXPRESIÓN DE DART EN UN HUÉSPED NO MAMÍFERO

[00106] Se transformaron células BL21DE3 (Novagen) con el plásmido pET25b(+) *T7-lac*+ 3G8/3G8 un una colonia resistente a amp se usó para sembrar el cutivo del caldo. Cuando el cultivo alcanzó 0,5 OD600 unidades, 0,5mM de IPTG se agregó para inducir la expresión. El cultivo se desarrolló a 30°C durante 2 horas y se recolectó el medio libre de células.

FIG. 28 DART ELISA

[00107] Los ELISA de unión a DART h3G8-h3G8 DART se condujeron con el uso de placas Maxisorp de 96 pocillos. Luego de la reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo de sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se interrumpió por 40 µl/pocillo de 1% H_2SO_4. El OD450 nm se leyó con el uso de un lector de placas de 96 pocillos y software SOFT max. La lectura obtenida se graficó con el uso de software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 29 MUERTE DE CÉLULAS B HUMANAS INDUCIDAS POR DART

[00108] Se incubaron PBMC humanas durante la noche con las moléculas indicadas. Se analizó la apoptosis por análisis FACS como porcentaje de población de $PI^+Annexin\text{-}V^+$ de células B (Células CD20+) sobre el total de la población FSC/SSC sin compuertas.

FIG. 30 CONSTRUCCIONES DART 8B5-CB3.1

[00109] Múltiples construcciones DART 8B5-CB3.1 se produjeron para ilustrar la presente invención. La construcción 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, codificó los plásmidos de expresión que se co-transfectaron en células HEK-293 para expresar 8B5-CB3.1 DART con o sin marca anti bandera con el uso de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio acondicionado se cosechó en cada tres días durante tres veces. El medio acondicionado se purificó a continuación con el uso de columna por afinidad CD32B.

FIG. 31 ELISA 8B5-CB3.1 DART

[00110] Se condujeron ELISA de competición 8B5-CB3.1 DART/ch8B5 se condujeron con el uso de placas Maxisorp de 96 pocillos. Luego de la reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo de sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se interrumpió por 40 µl/pocillo de 1% H_2SO_4. El OD450 nm se leyó con el uso de un lector de placas de 96 pocillos y software SOFT max. La lectura obtenida se graficó con el uso de software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 32 ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE ESTRUCTURA DART TETRAVALENTE

[00111] Ilustra la estructura general de una especie DART producida a través del montaje de cuatro cadenas de polipéptidos. Los cuatro dominios que se unen al antígeno del DART similar a Ig se muestran como elipses grises rasgadas y oscuras.

FIG. 33 DART TETRAVALENTE SÍMIL Ig

[00112] Proporciona una visualización esquemática de los sitios que se unen al epítope de un DART tetravalente símil Ig.

FIG. 34 ELISA DE UNIÓN a mCD32-hCD16A

[00113] Proporciona los resultados de ELISAs que demuestran que la especie DART tetravalente símil Ig del **Ejemplo 6.10** se une al antígeno con mayor afinidad que el anticuerpo de control (ch-mCD32 mAb) o otras especies DART.

FIG. 35 ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE MOLÉCULAS DART DE IG

[00114] Proporciona una visualización esquemática de moléculas DART de Ig. La especificidad se indica por medio de regiones sobreadas, con patrones o de color blanco, las regiones constantes se muestran en negro, y los enlaces de disulfuro se indican por líneas negras punteadas. Los términos N de todas las cadenas de proteínas se orientan hacia la parte superior de la figura, mientras que los términos C de todas las cadenas de proteínas se orientan hacia la parte inferior de la Figura. Las ilustraciones A-E son biespecíficas y las ilustraciones F-J son triespecíficas. Las ilustraciones A and E son tetravalentes. Las ilustraciones B, C, F, I, y J son hexavalentes. Las ilustraciones D, G, y H son octavalentes. Remitirse a las Figuras 1, 2, 9, 14 y 17 y a la sección 3.1 para obtener descripciones detalladas de los dominios individuales.

FIG. 36 CAPACIDAD DE UNIÓN DE DIACUERPO BIOESPECÍFICO HU2B6 4.5-HU3G8 5.1

[00115] La **Figura 36** muestra la capacidad de el diacuerpo bioespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 (cuadrados) de unirse a CD32B y CD16a con relación a diacuerpos Hu2B6 4.5 o Hu3G8 5.1 (triángulos).

FIG. 37 ESQUEMA DE DERIVADOS DART DE E-COIL Y K-COIL

[00116] La **Figura 37** ilustra la confirmación general de derivados DART E-coil y K-coil.

FIG. 38 DISPOSICIONES HÉLICE DE SEPARADORES E-COIL Y K-COIL PREFERIDOS

[00117] La **Figura 38** muestra las disposiciones hélice de la secuencia "E-coil" preferida $(\mathbf{EVAALEK})_4$ (**SEC ID NRO.: 299**) y la secuencia "K-coil" preferida $(\mathbf{KVAALKE})_4$ (**SEC ID NRO.: 300**).

FIG. 39 DERIVADOS DART QUE CONTIENEN Fc de E-COIL y K-COIL

[00118] La **Figura 39** ilustra las diferentes especies de derivados DART que contienen Fc de E-coil y K-coil que pueden formarse por medio de intercambio de cadena.

FIG. 40 CROMATOGRAFÍA POR EXCLUSIÓN DE TAMAÑO SOBRE DERIVADOS E-COIL Y/O K-COIL Y DERIVADOS QUE CONTIENEN FC- DE E-COIL Y/O K-COIL DE DARTS h2B6YAhCB3

[00119] La **Figura 40** muestra los resultados de cromatografía por exclusión de tamaño sobre Derivados E-coil y/o K-coil y derivados que contienen Fc- de E-coil y/o K-coil de h2B6YAhCB3 DARTS. Se analizaron cuatro especies de dichas moléculas; todas tenían un E-coil y un K-coil: EK (sin región Fc), 2,1 mg; EFc/K (Fc ligado a E-coil), 2,7 mgs; E/KFc (Fc ligado a K-coil), 1,8 mgs; EFc/KFc (Fc ligado al K-coil y el E-coil del mismo DART), 2,0 mg

FIG. 41 ESTRUCTURA DE MOLÉCULAS DE DÍMEROS PRODUCIDAS

[00120] La **Figura 41** muestra la posible estructura de la molécula de dímero producida identificada en la cromatografía por exclusión de tamaño de la **Figura 40**.

FIG. 42 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO CON GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS DE LOS DERIVADOS DE E-COIL Y/O K-COIL Y DERIVADOS DART QUE CONTIENEN FC DE E-COIL Y/O K-COIL DE h2B6YAhCB3

[00121] La **Figura 42** muestra los resultados de un análisis electroforético con gel de poliacrilamida SDS de las fracciones obtenidas de la cromatografía por exclusión de tamaño (**Figura 40**) de derivados E-coil y/o K-coil y derivados que contienen Fc- de E-coil y/o K-coil de h2B6YAhCB3 DARTs. Hileras circundantes: controles de marcador molecular; Hilera 1: EK (sin región Fc); Hilera 2: EFc/K, fracción agregada; Hilera 3: EFc/K, fracción de monómero; Hilera 4: E/KFc, fracción agregada; Hilera 5: E/KFc, fracción de monómero; Hilera 6: EFc/KFc, fracción agregada; Hilera 7: EFc/KFc, fracción de dímero; Hilera 8: EFc/KFc, fracción de monómero.

FIG. 43 ANÁLISIS DE ELISA DE UNIÓN BIESPECÍFICA DE

[00122] La **Figura 43** muestra el resultado de un ELISA de unión biespecífica que compara derivados DART de E-coil / K-coil que contienen Fc h2B6YAhCB3 (EFc/K o E/KFc), h2B6YAhCB3 DART, control y un derivado DART EFc/KFc h2B6YAhCB3.

FIG. 44 HABILIDAD DE LOS DERIVADOS E-COIL Y/O K-COIL Y DERIVADOS DARTS QUE CONTIENEN FC- DE E-COIL Y/O K-COIL

DE h2B6YAhCB3 PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T

[00123] La **Figura 44** muestra la capacidad de los derivados DARTS de E-coil y/o K-coil y derivados que contienen Fc- de E-coil y/o K-coil de h2B6YAhCB3 para inhibir la proliferación de células T.

FIG. 45 ABD-DART hCD16-hCD32B

[00124] La **Figura 45** muestra una visualización esquemática de una molécula de anticuerpo recombinante, ABD-DART hCD16-hCD32B compuesta por el dominio ABD3 de proteína de estreptococo G fusionada a un DART biespecífico recombinante que es inmuno reactivo con lols antígenos hCD16 y hCD32B.

FIG. 46A-46J AFINIDAD DE UNIÓN DE ABD-DART hCD16-hCD32B

[00125] Se recubrieron placas de ELISA con cualquiera de antígeno CD16 (**Figura 46A**) o human serum albumin (**Figura 46B**) a una concentración de 2μg/mL. Concentraciones variables de ABD-DART hCD16-hCD32B (■) y DART de control hCD16-hCD32B (○) comenzando con 2μg/mL se unieron. Se agregó antígeno sD32B biotinilado a la placa seguido de Estreptavidina conjugada con HRP para detección. La **Figura 46C** muestra que la molécula ABD-DART era capaz de unión simultánea a CD32B, CD16A y HSA. Las **Figuras 46D-46I** demuestran que el ABD-DART hCD16-hCD32B y su derivado de fusión ABD se encontraron que exhiben unión equivalente a CD32B soluble (sCD32B) y a CD16A(158F) soluble (sCD16A). La **Figura 46J** demuestra que la fusión DART ABD mantuvo la unión bi-específica de su DART de origen, y mostró la unión a sCD16A y CD32B que no se vio afectado por la presencia de albúmina de suero humano.

FIG. 47A/47B CITOTOXICIDAD DE PROTEÍNAS DART

[00126] La **Figura 47A** demuestra citotoxicidad mediada por PBMC de Proteínas DART. Se realizaron ensayos ADCC con el uso de líneas de células B humanas, Daudi como células diana incubadas con PBMC como células efectoras. Los ensayos individuales se realizaron por triplicado en una proporción de efector a blanco de 20:1 y una titulación de los anticuerpos: hCD16A-hCD32B DART (●) y hCD16A-hCD32B ABD DART (■). La citotoxicidad mediada por células se midió por ensayo de liberación de LDH. La menor curva a 10^0 es hCD16A-hCD32B ABD DART (■). La **Figura 47B** demuestra que el DART CD16xCD32B se une a células efectoras que expresan CD16B y por lo tanto recluta dichas células para matar (por matanza redirigida) células que expresan CD32B.

FIG. 48 PROPIEDADES DE FARMACOCINÉTICA MEJORADAS DE ABD-DART hCD16-hCD32B EN RATONES C57Bl/6

[00127] Los ratones (n=3) se inyectaron con una inyección intravenosa única de (A) ABD-DART hCD16-hCD32B (●) y (B) hCD16-hCD32B DART (▲) a 5mg/kg. Se recolectó el suero de ratón en varios momentos de medición y las concentraciones de proteína en el suero

se calificaron por ELISA. Los cálculos de farmacocinética se realizaron con el uso de WinNonlin Professional 5,1.

FIG. 49A-49C ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VIVO DEL ABD-DART

[00128] Las **FIG. 49A-49C** demuestran que el ABD-DART hCD16-hCD32B mantenía y exhibía actividad biológica, *in vivo*, después de la administración a ratones. Una dosis única del ABD-DART o su DART de origen en ratones Tg (mCD16-/-hCD16A+32B+) se encontró que es capaz de deprimir selectivamente las concentraciones de células B (**Figura 49A**) sin afectar las concentraciones de células T (**Figura 49B**) o células PM (**Figura 49C**).

FIG. 50A-50E ACTIVIDAD DE HER2 x TCRb SOBRE EL PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE BAJA EXPRESIÓN DE HER2

[00129] Las moléculas DART que tienen dominios de unión al receptor de Her2 y células T (TCR) se analizaron para determinar su capacidad de mediar la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de vesícula que se habían caracterizado previamente como que exhiben bajos niveles de expresión de HER2 (y de este modo se hace refractario al tratamiento con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®. Las líneas celulares de cáncer de mama analizadas son ZR75-1 (HER2 2+) (**FIG. 50A**), MCF-7 (HER2 1+) (**FIG. 50B**) y MDA-MB468 (HER2-ve) (**FIG. 50C**). Las líneas celulares que no son de cáncer de mama analizadas son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (**FIG. 50D**) y SW780 (línea celular de cáncer de vesícula) (**FIG. 50E**).

FIG. 51A-51B PURIFICACIÓN DE KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (SEC ID NRO.: 313) - E COIL Y 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (SEC ID NRO.: 314) POLIPÉPTIDOS

[00130] Las **FIG. 51A-51B** muestran la purificación de polipéptidos KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (**SEC ID NRO.: 313**) - E Coil y 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (SEC ID NRO.: 314).

FIG. 52 ESPECIFICIDAD DE UNIÓN DE DART KYK2-4420 VF

[00131] La **FIG. 52** muestra la especificidad de unión de DART KYK2-4420 VF.

FIG. 53 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pPAL7 KCOIL-ABD

[00132] La **FIG. 53** muestra una descripción esquemática de la construcciónion del plásmido pPAL7 Kcoil -ABD.

FIG. 54 ANÁLISIS POR TRANSFERENCIA WESTERN DE PROTEÍNA ABD K COIL PURIFICADA POR LA RESINA DE PURIFICACIÓN PROFINITY EXACT™ PURIFICATION RESIN

[00133] La **Figura 54** muestra un análisis por transferencia Western de proteína ABD K coil purificada por la resina de purificación PROFINITY EXACT™ PURIFICATION RESIN (pequeña escala de 10 ml de cultivo). Hileras 1 y 5: lisatos crudos; hileras 2 y 6: fluyen a través, hileras 3, 4, 8, y 9: proteína purificada; hilera 7: Marcador. Anticuerpo primario: Anticuerpo policlonal anti-EK de conejo; Anticuerpo secundario: HRP anti conejo.

FIG. 55 ANÁLISIS POR SDS-PAGE DE PROTEÍNA ABD K COIL PURIFICADA POR LA RESINA DE PURIFICACIÓN PROFINITY EXACT™

[00134] La **Figura 55** muestra los resultados de Análisis por SDS-PAGE sobre las fracciones eluidas de la resina de purificación PROFINITY EXACT™ PURIFICATION. L: Lisato de E. coli crudo; FT: Fluyen a través; W: Lavado; M: Marcador.

FIG. 56A-56C UNIÓN DE DART ABD KYK2 4420 EK POR ELISA DE AFINIDAD DUAL

[00135] Las **Figuras 56A-56C** muestran resultados de ELISA que demuestran que los complejos KYK2-4420 VF DART con la molécula de K Coil-ABD forman un ABD DART E Coil – K Coil que tiene propiedades mejoradas. **Figura 56A**: DARTs capturados con NKG2D Fc y detectados con anticuerpo anti-EK monoclonal biotinilado. **Figura 56B**: DARTs capturados con anticuerpo-EK monoclonal y detectados con albúmina humana-HRP. **Figura 56C**: DARTs capturados con NKG2D Fc y detectados con anticuerpo anti-FITC biotinilado. Los resultados de ELISA muestran que la totalidad de los dominios en el complejo puede unirse a sus respectivos ligandos.

FIG. 57 ELISA DE ABD DESINMUNIZADO

[00136] La **Figura 57** muestra resultados de ELISA que demuestran los cambios en la unión causados por modificaciones en la secuencia de dominios de unión a la albúmina.

FIG. 58 ENSAYO DE UNIÓN A LA ALBÚMINA

[00137] La **Figura 58** muestra el resultado de ensayos de unión a la albúmina para las variantes de ABD Y61A/I65A, Y61A/N66D, L64A/I65A* y L64A/N66D y para el tipo salvaje.

FIG. 59 ENSAYO DE UNIÓN A LA ALBÚMINA

[00138] La **Figura 59** muestra el resultado de ensayos de unión a la albúmina para las variantes de ABD L64G/N66D, I65A/N66D, N66S/T70S* e Y61A/N66S/T70S y para el tipo salvaje.

FIG. 60 ENSAYO DE UNIÓN A LA ALBÚMINA

[00139] La **Figura 60** muestra el resultado de ensayos de unión a la albúmina para las variantes de ABD Y60A/Y61A, Y60T/Y61A, I65A/N66D/V71A, Y61A/I65A/V71A, L64A/N66D/V71A y para el tipo salvaje.

FIG. 61 ENSAYO DE UNIÓN A LA ALBÚMINA

[00140] La **Figura 61** muestra el resultado de ensayos de unión a la albúmina para las variantes de ABD Y60A/Y61A/V71A, Y60T/Y61A/V71A, L64A/I65A/V71A y para el tipo salvaje.

FIG. 62 ENSAYO DE UNIÓN A LA ALBÚMINA

[00141] La **Figura 62** muestra el resultado de ensayos de unión a la albúmina para las variantes de ABD L64G/I65A/V71A, L64G/N66D/V71A, Y61A/T70S, N66S, T70S, Y61A/N66S, L64A/I65A y para el tipo salvaje.

FIG. 63 PROPIEDADES DE FARMACOCINÉTICA MEJORADAS DE LAS VARIANTES CD16xCD32B ABD-DART Y ABD-DART EN RATONES C57BL/6

[00142] La **Figura 63** muestra las propiedades de farmacocinética mejoradas de las variantes CD16 x CD32B ABD-DARTS y ABD-DART en ratones C57Bl/6. Los ratones (n=3) se inyectaron con una inyección intravenosa única de ABD- Proteínas DART a 5 mg/kg. Se recolectó el suero de ratón en varios momentos de medición y las concentraciones de proteína en el suero se calificaron por ELISA. Los cálculos de farmacocinética se realizaron con el uso de WinNonlin Professional 5.1

FIG. 64A y 64B PROTEÍNAS DART ABD MULTIVALENTES

[00143] Las **Figuras 64A y 64B** ilustran las estructuras de DARTs que contienen ABDs multivalentes, construidas por fusión de ABDs al final de ambas cadenas (hCD16xhCD32B E ABD/K ABD DART) (**Figura 64A**) o por fusión de ABDs en tánden al final de una cadena (hCD16xhCD32B E ABD ABD/K DART) (**Figura 64B**).

FIG. 65(A-C) ACTIVIDAD BIESPECÍFICA DE ABD DARTs hCD16xhCD32B

[00144] Las **Figuras 65A-65C** ilustran la actividad biespecífica de hCD16xhCD32B ABD DARTs con el uso de ELISA específico dual. Se recubrieron placas de ELISA con 2 µg/ml de antígeno CD16. Las concentraciones variables de ABD DARTs y Fc DART se unieron a la placa. Finalmente se agregó antígeno sD32B biotinilado a la placa seguido de Estreptavidina conjugada con HRP para detección.

FIG. 66 VIDA MEDIA SÉRICA DE DARTS ABD Y DARTS FC

[00145] La Figura 66 muestra los resultados de un estudio de PK *in vivo* en el cual los ratones C57Bl/6 recibieron una sola inyección IV de DARTS ABD o DARTs Fc (5 mg/kg) con el fin de evaluar vida media sérica.

5. DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[00146] Cada cadena de polipéptido de la molécula de diacuerpo comprende un dominio VL y un dominio VH, que están ligados en forma covalente de manera tal que los dominios estén limitados de auto armarse. La interacción de dos de las cadenas de polipéptidos producirán dos pares de VL-VH, formando dos sitios de unión al epítope, *es decir*, una molécula bivalente. Ninguno de los dominios VH o VL se restringe a ninguna posición dentro de la cadena de polipéptidos, *es decir*, se restringe al término amino (N) o carboxi (C), como tampoco se restringen los dominios en sus posiciones relativas entre sí, *es decir*, el dominio VL puede ser N-terminal al dominio VH y viceversa. La única restricción es que una cadena de polipéptido complementaria esté disponible con el fin de formar diacuerpo funcional. Donde los dominios VL y VH derivan del mismo anticuerpo, las dos cadenas

complementarias de polipéptidos pueden ser idénticas. Por ejemplo, donde los dominios de unión derivan de un anticuerpo específico para el epítope A (es decir, el dominio de unión se forma a partir de una interacción de VL_A-VH_A), cada polipéptido comprenderá un VH_A y un VL_A. La homodimerización de dos cadenas de polipéptidos del anticuerpo producirá la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_A, lo que produce un anicuerpo monoespecífico. Donde los dominios VL y VH derivan de anticuerpos específica para diferentes antígenos, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas de polipéptidos diferentes, *es decir*, formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico, una cadena de polipéptido comprenderá un VL_A y un VL_B; la homodimerización de dicha cadena producirá la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_B, ya sea sin unión o de unión impredecible. En contraste, donde dos cadenas de polipéptidos diferentes estén libres para interactuar, *por ej.*, en un sistema de expresión recombinante, uno que comprende un VL_A y u VH_B y el otro que comprende un VL_B y un VH_A, dos sitios de unión diferentes formarán: VL_A-VH_A y VL_B-VH_B. Para los pares de cadenas de polipéptidos, la posibilidad de deficiencia de alineación o de unión de las dos cadenas es una posibilidad, *es decir*, la interacción de dominios VL-VL o VH-VH; sin embargo, la purificación de diacuerpos funcionales se maneja fácilmente en base a la inmunoespecificidad del sitio de unión dimerizado apropiadamente con el uso de cualquier método basado en afinidad conocido en el área o ejemplificado en este documento, *por ej.*, cromatografía por afinidad.

[00147] En otras realizaciones, una o más de las cadenas de polipéptidos del diacuerpo comprende un dominio Fc. Los dominios Fc en las cadenas de polipéptidos de las moléculas de diacuerpo dimerizarán con preferencia, lo que produce la formación de una molécula del diacuerpo que exhibe propiedades similares a la inmunoglobulina, interacciones *por ej.*, Fc-FcγR,. Los diacuerpos que contienen Fc pueden ser dímeros, *por ej.*, formados por dos cadenas de polipéptidos, donde cada una comprende un dominio VH, un dominio VL y un dominio Fc. La dimerización de dichas cadenas de polipéptidos produce un diacuerpo bivalente que comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la de un anticuerpo bivalente no modificado **(FIG. 11)**. Dichas moléculas de diacuerpo exhibirán fenotipos alterados con relación a una inmunoglobulina de tipo salvaje, *por ej.*, vida media sérica alterada, propiedades de unión, etc. En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros. Dichos tetrámeros comprenden dos cadenas de polipéptidos “más pesadas”, es decir una cadena de polipéptido que comprende un dominio VL, VH y un dominio Fc, y dos cadenas de polipéptidos “más livianas”, *es decir*, cadena de polipéptido que comprende un VL y un VH. Dichas cadenas más livianas y más pesadas interactúan para formar un monómero, y dichos monómeros interactúan por medio de sus dominios Fc sin pares para formar una molécula con aspecto de Ig. Dicho diacuerpo con aspecto de Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico.

[00148] Los por lo menos dos sitios de unión de la molécula de diacuerpo pueden reconocer epítopes iguales o diferentes. Diferentes epítopes pueden ser del mismo antígeno o epítopes de diferentes antígenos. En una realización, los epítopes son de células diferentes. En otra realización, los epítopes son de antígenos de superficie celular en la misma célula o virus. Los sitios de unión a los epítopes pueden reconocer cualquier antígeno al cual puede generarse un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de la superficie celular, marcadores autoinmunes, proteínas virales, fármacos, etc. En aspectos particulares, por lo menos un sitio de unión al epítope del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tales como una célula B o célula T, una célula fagocitótica, una célula asesina natural (NK) o una célula dendrítica.

[00149] Cada dominio de la cadena de polipeptido del diacuerpo, *es decir*, el dominio VL, VH y FC puede ser separado por una ligadura de péptido. La ligadura de péptido puede ser de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos. En ciertas realizaciones la secuencia de ligadura de aminoácidos es GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) codificada por la secuencia de ácido nucleico **(SEC ID NRO.: 74)**.

[00150] En ciertas realizaciones, cada cadena de polipéptido de la molécula de diacuerpo se diseña para comprender por lo menos un residuo de cisteína que interactuará con una contraparte por lo menos un residuo de cisteína en una segunda cadena de polipéptido de la invención para formar un enlace de disulfuro entre cadenas. Dichos enlaces de disulfuro entre cadenas sirven para estabilizar la molécula de diacuerpo, mejorando la expresión y recuperación en sistemas recombinantes, lo que produce una formulación estable y consistente así como también mejorar la estabilidad del produto aislado y/o purificado *in vivo*. Dicho por lo menos un residuo de cisteína puede introducirse como una cadena de aminoácido simple o como parte de una secuencia de aminoácido más grande, *por ej*. dominio de bisagra, en cualquier porción of the polypeptide chain. En una realización específica, dicho por lo menos un residuo de cisteína está diseñado para ocurrir en el extremo terminal C de la cadena de polipéptidos. En algunas realizaciones, dicho por lo menos un residuo de cisteína se introduce en la cadena de polipeptido dentro de la secuencia de aminoácidos LGGC. En una realización específica, el extremo terminal C de la cadena de polipeptido que comprende la molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LGGC. En otra realización, dicho por lo menos un residuo de cisteína se introduce en el polipéptido dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de bisagra, *por ej.* **SEC ID NRO.: 1** o **SEC ID NRO.: 4**. En una realización específica, el extremo terminal C de una cadena de polipéptido de la molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de una IgG dominio de bisagra, *por ej*. **SEC ID NRO.: 1**. En otra realización, el extremo terminal C de una cadena de polipéptido de una molécula del diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**, que pueden codificarse por medio de secuencia de nucleótidos **(SEC ID NRO.: 78)**. En otras

realizaciones, dicho por lo menos un residuo de cisteína se introduce en la cadena de polipeptido dentro de la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC **(SEC ID NRO.: 17)**, que pueden codificarse por medio de la secuencia de nucleótidos **(SEC ID NRO.: 76)**. En una realización específica, el extremo terminal C de una cadena de polipéptido que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC **(SEC ID NRO.: 17)**, que pueden codificarse por medio de la secuencia de nucleótidos **(SEC ID NRO.: 76)**. Incluso, en otras realizaciones, dicho por lo menos un residuo de cisteína se introduce en la cadena de polipeptido dentro de la secuencia de aminoácidos FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**, que pueden codificarse por medio de la secuencia de nucleótidos **(SEC ID NRO.: 75)**. En una realización específica, el extremo terminal C de una cadena de polipéptido que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**, que pueden codificarse por medio de la secuencia de nucleótidos **(SEC ID NRO.: 75)**.

[00151] En ciertas realizaciones, la molécula de diacuerpo comprende por lo menos dos cadenas de polipéptidos, cada una de las cuales comprende la secuencia de aminoácidos LGGC y están ligadas en forma covalente por una unión de disulfuro entre los residuos de cisteína en dichas secuencias LGGC. En otra realización específica, la molécula de diacuerpo comprende por lo menos dos cadenas de polipéptidos, una de las cuales comprende la secuencia FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)** mientras que la otra comprende un dominio de bisagra (que contiene por lo menos un residuo de cisteína), en donde dichas por lo menos dos cadenas de polipéptidos están ligadas en forma covalente por una unión de disulfuro entre el residuo de cisteína en FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)** y un residuo de cisteína en el dominio de bisagra. En aspectos particulares, el residuo de cisteína responsable del enlace de disulfuro ubicado en el dominio de bisagra es Cys-128 (según la numeración de acuerdo con Kabat EU; located en el dominio de bisagra de una cadena pesada de IgG intacta, no modificada) y el residuo de cisteína contraparte en la **SEC ID NRO.: 23** es Cys-214 (según la numeración de acuerdo con Kabat EU; ubicado en el extremo terminal C de una cadena de IgG intacta, no modificada) (Elkabetz *et al.* (2005) *"Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains,"* J. Biol. Chem. 280:14402-14412; incorporada en este documento en su totalidad a modo de referencia). Incluso, en otras realizaciones, el por lo menos un residuo de cisteína está diseñado para ocurrir en el extremo terminal N de la cadena de aminoácidos. *Incluso en otras realizaciones*, el por lo menos un residuo de cisteína está diseñado para ocurrir en la porción de la ligadura de la cadena de polipeptido de la molécula de diacuerpo. En realizaciones adicionales, the VH o VL dominio se diseña para comprender por lo menos una modificación de aminoácido con relación al dominio VH o VL de origen de manera tal que dicha modificación de aminoácido comprende una sustitución de un aminoácido de origen con cisteína.

[00152] La invención abarca moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc o porción de los anteriores (*por ej*. un dominio CH2, o dominio CH3). El dominio Fc o porción de los anteriores puede derivar de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina que incluyen, aunque sin limitarse a, IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En realizaciones preferidas, el dominio Fc (o porción de los anteriores) deriva de IgG. En realizaciones específicas, el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de los anteriores. En una realización, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, which Fc dominio comprende un dominio CH2 y dominio CH3 seleccionado en forma independiente de cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir un dominio Fc que comprende el dominio CH2 derivado de IgG y el dominio CH3 que deriva de IgE, o el dominio CH2 derivado de IgG1 y el dominio CH3 derivado de IgG2, etc.). Dicho dominio de Fc puede diseñarse en una cadena de polipéptido que comprende la molécula de diacuerpo de la invención en cualquier posición con relación a otros dominios o porciones de dicha cadena de polipéptido (*por ej.*, el dominio de Fc, o porción de los anteriores, puede ser del extremo terminal C para ambos dominios VL y VH del polipéptido de la cadena; puede ser n-terminal para ambos dominios VL y VH; o puede ser n-terminal para un dominio y de extremo terminal C para otro (*es decir*, entre dos dominios de la cadena de polipéptidos)).

[00153] La presente invención abarca, además, moléculas que comprenden un dominio de bisagra. El dominio de bisagra es derivado de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina que incluyen IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En realizaciones preferidas, el dominio de bisagra deriva de IgG, en donde el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de los anteriores. Dicho dominio de bisagra puede diseñarse en una cadena de polipéptido que comprende la molécula de diacuerpo junto con un dominio Fc de manera tal que la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc-bisagra. En ciertas realizaciones, el dominio Fc y de bisagra se seleccionan en forma independiente de cualquier isotipo de inmunoglobulina conocido en la técnica o ejemplificado en este documento. En otras realizaciones el dominio Fc y de bisagra se separan por medio de por lo menos un dominio distinto de la cadena de polipéptidos, *por ej.*, el dominio VL. El dominio de bisagra, o en forma opcional el dominio bisagra-Fc, puede diseñarse en un polipéptido de la invención en cualquier posición con relación a otros dominios o porciones de dicha cadena de polipéptido. En ciertas realizaciones, una cadena de polipéptido de la invención comprende un dominio de bisagra, cuyo dominio de bisagra se encuentra en el extremo terminal C de la cadena de polipéptidos, en donde dicha cadena de polipéptido no comprende un dominio Fc. Incluso, en otras realizaciones, una cadena de polipéptido de la invención comprende un dominio Fc-bisagra, cuyo dominio bisagra-Fc se encuentra en el extremo terminal C de la cadena de polipéptidos. En realizaciones adicionales, una cadena de polipéptido de la invención comprende un dominio Fc-bisagra, cuyo dominio bisagra-Fc se encuentra en el extremo terminal N de la cadena de polipéptidos.

[00154] Como se discutió con anterioridad, la invención abarca multímeros de cadenas de polipéptidos, cada una de cuyas cadenas de polipéptidos comprenden un dominio VH y VL. En ciertos aspectos, las cadenas de polipéptidos en dichos multímeros comprenden en forma adicional un dominio Fc. La dimerización de los dominios Fc conduce a la formación de una molécula del diacuerpo que exhibe funcionalidad similar a la inmunoglobulina, *es decir*, función mediada por Fc (*por ej., interacción Fc-FcγR*, unión complementaria, etc.). En ciertas realizaciones, los dominios VL y VH que comprende cada cadena de polipéptido tienen la misma especificidad, y dicha molécula del diacuerpo es bivalente y monoespecífica. En otras realizaciones, los dominios VL y VH que comprende cada cadena de polipéptido tienen diferente especificidad y el diacuerpo es bivalente y biespecífico.

[00155] Incluso, en otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo de la invención abarcan tetrámeros de cadenas de polipéptidos, cada una de cuya cadena de polipéptido comprende un dominio VH y VL. En ciertas realizaciones, dos cadenas de polipéptidos del tetrámero comprenden en forma adicional un dominio Fc. El tetrámero por lo tanto está formado por dos cadenas de polipéptidos “más pesadas”, donde cada una comprende un dominio VL, VH y Fc, y dos cadenas de polipéptidos “más livianas”, que comprenden un dominio VL y VH. La interacción de una cadena más pesada y más liviana en un monómero bivalente acoplado con dimerization de dichos monómeros por medio de los dominios Fc de las cadenas más pesadas conducirá a la formación de una molécula con estructura de inmunoglobulina tetravalente (se ejemplifica en el Ejemplo 6.2 y Ejemplo 6.3). En ciertos aspectos los monómeros son iguales, y la molécula tetravalente del diacuerpo is monospecific o biespecífico. En otros aspectos los monómeros son diferentes, y la molécula tetravalente es biespecífica o tetraespecífica.

[00156] La formación de una molécula del diacuerpo tetraespecífico como se describió con anterioridad requiere la interacción de cuatro diferentes de polipéptidos. Dichas interacciones son difíciles de lograr con eficiencia dentro de un sistema de producción recombinante de células simples, debido a las muchas variantes de potenciales emparejamientos erróneos de la cadena. Una solución para aumentar la probabilidad de emparejamientos erróneos, es diseñar mutaciones del tipo “bultos en orificios” en los pares deseados de la cadena de polipéptidos. Dichas mutaciones favorecen la heterodimerización por sobre la homodimerización. Por ejemplo, con respecto a interacciones Fc-Fc, una sustitución de aminoácidos (con preferencia una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral volumétrico que forma un “bulto”, *por ej.,* tryptophan) puede introducirse en el dominio CH2 o CH3 de manera tal que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado en forma similar y obligará al dominio mutado a emparejarse con un dominio en el cual una complementariedad, o mutación de acomodación se ha diseñado, *es decir,* ‘el orificio’ (*por ej.*, una sustitución con glicina). Dichos conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par del polipéptidos que comprende la molécula de diacuerpo, y además, se diseña en una porción de las cadenas de polipéptidos de dicho par. Los métodos de diseño de proteínas para favorecer la

heterodimerización por sobre la homodimerización se conocen muy bien en la materia, en particular con respecto a el diseño de moléculas con aspecto de inmunoglobulina, y se abarcan en este documento (véase por ej., Ridgway *et al.* (1996) *"'knobs-in-holes' Engineering Of CH3 Antibody Domains for Heavy Chain Heterodimerization ,"* Proteína Engr. 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) *"Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer usina A Phage Display Library,"* J. Mol. Biol. 270: 26-35, y Xie *et al.* (2005) *"A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expresión y Tumor Cell Lysis,"* J. Immunol. Métodos 296:95-101; cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad).

[00157] La invención abarca, además, moléculas de diacuerpo que comprenden dominios variantes Fc de bisagra o variantes Fc (o porción de los anteriores), cuyo dominio de Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácido (*por ej*. sustitución, inserción, eliminación) con relación a un dominio Fc tipo salvaje comparable o dominio Fc de bisagra (o porción de los anteriores). Las moléculas que comprenden dominios variantes Fc o dominiso Fc de bisagra (o porción de los anteriores) (*por ej*., anticuerpos) normalmente tienen fenotipos alterados con relación una moléculas que comprenden dominios Fc tipo salvaje o dominios Fc de bisagra o porciones de los anteriores. El fenotipo variante puede expresarse como vida media sérica alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o alteración de la función efectora según se evalúa en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófago. Los dominios variantes Fc identificados como aquellos que alteran la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE UU 2005/0037000 y 2005/0064514, Solicitudes Provisionales de los EE UU 60/626,510, presentada el 10 de noviembre de 2004, 60/636,663, presentada el 15 de diciembre de 2004, y 60/781,564, presentada el 10 de marzo de 2006, y Solicitudes de Patentes de EE UU 11/271, 140, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305,787, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los Inventores, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

[00158] Los diacuerpos biespecíficos de la invención pueden unir en forma simultánea dos epítopes separados y distintos. En ciertas realizaciones los epítopes son del mismo antígeno. En otras realizaciones, los epítopes son de diferentes antígenos. En realizaciones preferidas, por lo menos un sitio de unión al epítope es específico para un determinante expresado en una célula efectora inmune (*por ej*. CD3, CD16, CD32, CD64, etc.) que se expresan en los linfocitos T, células asesinas naturales (NK) u otras células mononucleares. En una realización, la molécula de diacuerpo se une a la célula determinante generadora de respuesta y además activa dicha célula efectora. En este aspecto, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden exhibir funcionalidad similar a Ig independiente de si comprenden en forma adicional un dominio Fc (*por ej.*, como se evalúa en cualquier ensayo de la función efectora conocido en la técnica o ejemplificado en este documento (*por ej*., ensayo ADCC). En ciertas

realizaciones el diacuerpo biespecífico de la invención se une tanto a un antígeno de cáncer en una célula tumoral como una célula efectora determinante mientras que activa dicha célula. En realizaciones alternativas, el diacuerpo biespecífico o molécula del diacuerpo de la invención puede inhibir la activación de una célula blanco, *por ej.*, efectora, por unión simultánea de, y de este modo entrecruzamiento, un receptor de activación e inhibición en la misma célula (*por ej.*, se une tanto a CD32A como CD32B, BCR y CD32B, o IgERI y CD32B) como se describió con anterioridad (*véase*, Sección de Antecedentes). En un aspecto adicional de esta realización, el diacuerpo biespecífico puede exhibir propiedades anti-virales por unión simultánea de dos epítopes neutralizantes en un virus (*por ej.*, epítopes RSV; epítopes WNV tales como E16 y E53).

[00159] En ciertas realizaciones, las moléculas biespecíficas de diacuerpo de la invención ofrecen oportunidades únicas para dirigir tipos de células específicas. Por ejemplo, el diacuerpo biespecífico o molécula del diacuerpo puede diseñarse para comprender una combinación de sitios que se unen al epítope que reconocen un conjunto de antígenos únicos para una célula de destino o tipo de tejido. En forma adicional, donde cualquiera o ambos de los antígenos individuales es/son bastante comunes separados en otro tejido y/o Tipo de Células, pueden usarse dominios de unión de baja afinidad para construir el diacuerpo o molécula del diacuerpo. Dichos dominios de baja afinidad serán incapaces de unirse al epítope o antígen individual con suficiente avidez para fines terapéuticos. Sin embargo, donde ambos epítopes o antígenos estén presentes en una célula o tejido de destino único, la avidez del diacuerpo o molécula del diacuerpo por la célula o el tejido, con relación a una célula o tejido que expresa solamente uno de los antígenos, aumentará de manera tal que dicha célula o tejido puede dirigirse en forma efectiva por la invención. Dicha molécula biespecífica puede exhibir unión potenciada a uno o ambos de sus antígenos de destino en células que expresan ambos de dichos antígenos con relación a un diacuerpo monoespecífico o un anticuerpo con una especificidad por solamente uno de los antígenos.

[00160] Con preferencia, las propiedades de unión de los diacuerpos de la invención se caracterizan por ensayo funcionales *in vitro* para determinar la actividad de unión y/o una o más funciones de la célula efectora del mediador de FcγR (mediadas por la interacción Fc-FcγRs o por la unión inmunoespecífica de una molécula del diacuerpo a un FcγR) (Remitirse a la sección 5.4.2 y 5.4.3). Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas, *por ej.*, diacuerpos, de la invención para un FcγR pueden determinarse con el uso de ensayos *in vitro* (ensayos con base bioquímica o inmunológica) conocidos en la materia para la determinación de la unión dominio-antígeno o interacción Fc-FcγRs, *es decir*, la unión específica de un antígeno a un dominio de unión o la unión específica de una región de Fc a un FcγR, respectivamente, que incluyen aunque sin limitarse a ensayo ELISA, ensayo por resonancia plasmónica de superficie, ensayos de inmunoprecipitación (Remitirse a la sección 5.4.2). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades similares de

unión en modelos *in vivo* (tales como aquellas que se describen y se divulgan en este documento) como aquellos ensayos de base *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos de base *in vitro* pero no exhiben el fenotipo deseado en *vivo*.

[00161] En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se diseñan para comprender un patrón de glicosilación alterada o una glicoforma alterada con relación a la porción comparable de la molécula patrón. Las glicoformas diseñadas pueden ser útiles para una variedad de finalidades, que incluyen, aunque sin limitarse a, potenciación de la función efectora. Las glicoformas diseñadas pueden generarse por medio de cualquier método conocido por los expertos en el arte, por ejemplo por medio del uso de cepas de expresión variantes o diseñadas, por la co-expresión con una o más enzimas, por ejemplo, DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTI11), por medio de la expresión de un diacuerpo de la invención en varios organismos o líneas celulares de varios organismos, o por la modificación de carbohidrato(s) después de que el diacuerpo se ha expresado y purificado. Los métodos para generar glicoformas diseñadas se conocen en la materia, e incluyen aunque no se limitan a aquellos que se describen en Umana *et al.* (1999) *"Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity,"* Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.* (2001) *"Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII,"* Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields *et al.* (2002) *"Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc gamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity,"* J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al.* (2003) *"The Absence Of Fucose But Not The Presence of Galactose o Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity,"* J Biol Chem 278:3466-3473) US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de diseño de glicosilación GlycoMAb™ (biotecnología GLYCART AG, Zurich, Suiza); cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. Véase, *por ej.*, WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki *et al.* (2004) *"Fucose Depletion From Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Entre IgG1 y FcGammaRIIIA,"* JMB, 336: 1239-49 cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00162] La invención abarca, además, la incorporación de aminoácidos no naturales para generar los diacuerpos de la invención. Dichos métodos are known to those skilled en la materia tales como those con el uso de the natural biosynthetic machinery to allow la incorporación de aminoácidos no naturales into proteínas, véase, *por ej.*, Wang *et al.* (2002)

"Expanding The Genetic Code," Chem. Comm. 1: 1-11; Wang *et al.* (2001) *"Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli,"* Science, 292: 498-500; van Hest *et al.* (2001) *"Protein-Based Materials, Toward A New Level Of Structural Control,"* Chem. Comm. 19: 1897-1904, cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. Las estrategias alternativas se basan en las enzimas responsables de la biosíntesis de amino acil-tARN, véase, *por ej*., Tang *et al.* (2001) *"Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Proteín Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host,"* J. Am. Chem. Soc. 123(44): 11089-11090; Kiick *et al.* (2001) *"Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli,"* FEBS Lett. 502(1-2):25-30; cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00163] En algunas realizaciones, la invención abarca métodos para la modificación de un dominio VL, VH o Fc de una molécula de la invención mediante el agregado o eliminación de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el carbohidrato de las proteínas se conocen muy bien en la materia y se abarcan dentro de la invención, *véase, por ej.*, Patente de los EE UU Nro. 6,218,149; EP 0 359 096 B1; U.S. Publication No. US 2002/0028486; WO 03/035835; U.S. Publication No. 2003/0115614; Patente de los EE UU Nro. 6,218,149; Patente de los EE UU Nro. 6,472,511; la totalidad de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00164] Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden construirse para comprender un dominio que es un ligando de unión para el receptor del Grupo 2D Asesino Natural. Dichos ligandos de unión, y en particular aquellos que no se expresan en células normales, incluyen la molécula de histocompatilibilidad 60 (H60), el producto del gen-1 inducible en su etapa inicial por ácido retinoico (RAE-1), y la transcripción 1 símil proteína murina que se une a UL16 (MULT1) (Raulet D.H. (2003) "*Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands*," Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. *et al.* (2005) "*Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells*," Blood 106:1711-1717). Los ligandos adicionales reactivos con NKG2D humano incluyen las moléculas relacionadas con la cadena de clase I de MHC polimórfico MICA y MICB (Diefenbach, A. *et al*. (1999) "*Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In*," Curr. Biol. 9(22):R851-R8533; Bauer, S. *et al*. (1999) "*Activation of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA*," Science 285(5428):727-729; Stephens, H.A. (2001) "MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?," Trends Immunol. 22:378-385.

[00165] La secuencia de MICA es **SEC ID NRO.: 311**:

MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH
LDGQPFLRCD RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL
AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW

TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV
LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT
QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
LVLQSHWQTF HVSAVAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAEG PELVSLQVLD
QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

[00166] La secuencia de MICB es **SEC ID NRO.: 312**:

PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE
DVLGAKTWDT ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED
SSTRGSRHFY YDGELFLSQN LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM
KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV SEGNITVTCR ASSFYPRNIT
LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNGTYQT WVATRIRQGE EQRFTCYMEH
SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKTS
AAEGP

[00167] Los anticuerpos que se unen en forma específica al receptor de células T incluyen el anticuerpo anti-TCR BMA 031 (Kurrle, R. *et al*. (1989) "*BMA 031 – A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application*," Transplant Proc. 21(1 Pt 1):1017-1019; Nashan, B. *et al*. (1987) "Fine Specificity Of A Panel of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex," Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. *et al*. (1991) "Construction, Expression, and Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell," J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, C.W. *et al*. (1991) "*Construction, Expresión y Caracterización de Humanized Antibodies Directed Against The Human α/β T Cell Receptor*," J. Immunol. 147(12):4366-4373). Los anticuerpos que se unen en forma específica al receptor NKG2D incluyen KYK-2,0 (Kwong, KY *et al*. (2008) "*Generation, Affinity Maturation, and Caracterización de A Human Anti-NKG2D humano Monoclonal Anticuerpo Con Dual Antagonistic And Agonistic Activity*," J. Mol. Biol. 384:1143-1156; y PCT/US09/54911).

[00168] A través del uso de dicho diacuerpo, la célula de destino se re-dirige ahora para ser una célula que puede unirse por células que forman el receptor (NKG2D). El receptor NKG2D se expresa en todas las células asesinas naturales humanas (y de otros mamíferos) (Bauer, S. *et al*. (1999) "*Activation of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA*," Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. *et al*. (2002) "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing*," Immunity 17(1):19-29) así como también en todas las células T $CD8^+$ (Groh, V. *et al*. (2001) "*Costimulation Of CD8αβ T Cells By NKG2D by the Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells*," Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. *et al*. (2002) "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing*," Immunity 17(1):19-29).

[00169] En forma alternativa, las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden construirse para comprender un dominio que es un ligando de unión para el receptor de células T ("TCR"). El TCR se expresa en forma negativa por células T CD4+ o CD8+, y permiten que dichas células reconozcan péptidos antigénicos que se uneny se presentan por proteínas MHC de clase I o clase II de células que presentan antígenos. El reconocimiento del complejo pMHC (péptido-MHC) por medio de un TCR inicia la propagación de una respuesta inmune celular que conduce a la producción de citoquinas y la lisis de la célula que presenta antígenos (véase, *por ej.*, Armstrong, K.M. *et al*. (2008) "*Conformational Changes And Flexibility In T Cell Receptor Recognition Of Peptide–MHC Complexes*," Biochem. J. 415(Pt 2):183–196; Willemsen, R. (2008) "*Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T Cell Epitopes For Adoptive T Cell Therapy*," Cytometry A. 73(11):1093-1099; Beier, K.C. *et al*. (2007) "*Master Switches Of T Cell Activation And Differentiation*," Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. *et al*. (2005) "*Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes*," Am. J. Ther. 12(6):534–550).

[00170] Por medio de la construcción de dichas moléculas de diacuerpo para comprender en forma adicional por lo menos un dominio que se une al epítope capaz de unirse a, por ejemplo, un receptor presente sobre la superficie de una célula de destino, dichas moléculas de diacuerpo serán moléculas DART y de este modo serán capaces de unirse a las células de destino y de este modo harán que las células de destino muestren el ligando de unión para el receptor del Grupo 2D Asesino Natural o para el TCR (cualquiera esté presente en el diacuerpo que se une a la célula) (véase, *por ej.*, Germain, C. *et al*. (2008) "*Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein*," Prot. Engineer. Design Selection 21(11):665-672).

[00171] Dichos diacuerpos pueden usarse para re-dirigir cualquier célula de destino deseada en una célula que es un blanco de lisis celular mediada por células NK o la citotoxicidad mediada por células T. En una realización, el dominio que se une al epítope del diacuerpo capaz de unirse a un receptor presente sobre la superficie de una célula de destino es un epítope que se une a un antígeno asociado con el tumor de manera tal que dirige dichas células con cáncer en sustratos para lisis celular mediada por células NK o la citotoxicidad mediada por células T. Es de particular interés un antígeno asociado con los tumores que es un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovarios, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer de cuello de útero, un antígeno de cáncer de páncreas, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer de vesícula, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer de testículos, un antígeno de cáncer de glioblastoma, un antígeno asociado con una enfermedad de las células B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma no de Hodgkins, o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

[00172] Los antígenos asociados con tumores apropiados para dicho uso incluyen A33 (un antígeno de carcinoma colo-rectal; Almqvist, Y. 2006, *Nucl Med Biol*. Nov;33(8):991-998); B1 (Egloff, A.M. *et al*. 2006, *Cáncer Res*. 66(1):6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther*. 2(6):577-84); beta-catenina (Prange W. *et al*. 2003 *J Pathol.* 201(2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. *et al*. 2005 *Int J Gynecol Cáncer* 15 Suppl 3:274-81); CD5 (Calin, G.A. *et al*. 2006 *Semin Oncol*. 33(2):167-73; CD19 (Troussard, X. *et al*. 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48); CD20 (Thomas, D.A. *et al*. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. *et al*. 2005 *Curr Top Microbiol Immunol*. 5;294:91-107); CD25 (Troussard, X. *et al*. 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 *Lab Hematol.* 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. *et al*. 2005 *Ann N Y Acad Sci*. 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 *Curr Oncol Rep*. 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. *et al*. 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48; Chu, P.G. *et al*. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. *et al*. 1998 *Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48); CDK4 (Lee, Y.M. *et al*. 2006 *Cell Cycle* 5(18):2110-4); CEA (antígeno carcinoembriónico; Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil*. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. *et al*. 2005 *Rev Invest Clin*. 57(6):814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. *et al*. 2006 *Curr Opin Immunol.* 18(2):206-13); EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico; Adenis, A. *et al*. 2003 *Bull Cancer*. 90 Spec No:S228-32); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. *et al*. 2002 *Oncogene* 21(57):8732-40; Rimon, E. *et al*. 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. *et al*. 2006 *Int J Cancer*. 118(1):123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. *et al*. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25); gp100 (Lotem, M. *et al*. 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S *et al*. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); human papillomavirus-E6/human papillomavirus-E7 (DiMaio, D. *et al*. 2006 *Adv Virus Res*. 66:125-59; KSA (17-1A) (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther*. 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. *et al*. 2005 *Curr Oncol Rep*. 7(5):377-82; MUC-1 (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil*. 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. *et al*. 2000 *J Cell Physiol*. 182(3):323-31); N-acetilglucosaminiltransferasa (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta*. 6;1473(1):21-34); p15 (Gil, J. *et al*. 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(9):667-77); PSA (antígeno específico de la próstata; Cracco, C.M. *et al*. 2005 *Minerva Urol Nefrol*. 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res*. 123:157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther*. 1(5):881-91); receptor de TNF (receptor de TNF-α, receptor de TNF-ß; o receptor de TNF-γ; van Horssen, R. *et al*. 2006 *Oncologist*. 11(4):397-408; Gardnerova, M. *et al*. 2000 *Curr Drug Targets*. 1(4):327-64); o receptor de VEGF (O'Dwyer. P.J. 2006 *Oncologist*. 11(9):992-8).

[00173] Los antígenos asociados con tumores adicionales para dicho uso (y publicaciones que divulgan específicamente anticuerpos reactivos para dichos antígenos) incluyen ADAM-9 (Publicación de Patente de los Estados Unidos Nro. 2006/0172350; Publicación por PCT Nro. WO 06/084075); ALCAM (Publicación por PCT Nro. WO 03/093443); Carboxipeptidasa M (Publicación de Patente de los Estados Unidos Nro. 2006/0166291); CD46 (Patente de los Estados Unidos Nro. 7,148,038; Publicación por PCT Nro. WO 03/032814); Citoqueratina 8 (Publicación por PCT Nro. WO 03/024191); Receptores de efrina (y en particular EphA2 (Patente de los Estados Unidos Nro. 7,569,672; Publicación por PCT Nro. WO 06/084226); Alfa-V-Beta-6 Integrina (Publicación por PCT Nro. WO 03/087340); JAM-3 (Publicación por PCT Nro. WO 06/084078); KID3 (Publicación por PCT Nro. WO 05/028498); KID31 (Publicación por PCT Nro. WO 06/076584); LUCA-2 (Publicación de Patente de los Estados Unidos Nro. 2006/0172349; Publicación por PCT Nro. WO 06/083852); Oncostatina M (Oncostatin Receptor Beta) (Patente de los Estados Unidos Nro. 7,572,896; Publicación por PCT Nro. WO 06/084092); PIPA (Patente de los Estados Unidos Nro. 7,405,061; Publicación por PCT Nro. WO 04/043239); RAAG10 (Patente de los Estados Unidos Nro. 7,527,969; Publicación por PCT Nro. WO 04/001381); ROR1 (Patente de los Estados Unidos Nro. 5,843,749); TES7 (Publicación por PCT Nro. WO 08/066691); y el Receptor de Transferrina (Patente de los Estados Unidos Nro. 7,572,895; Publicación por PCT Nro. WO 05/121179).

[00174] Además son de interés los antígenos específicos para agentes infecciosos particulares, por ej., viral agents que incluyen, aunque sin limitarse a virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de hepatitis B (HBV), gripe, virus del papiloma humano (HPV), pie y boca (coxsackievirus), el virus de la rabia, virus de herpes simple (HSV), y los agentes causantes de gastroenteritis, que incluyen rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus y virus de Norwalk; agentes bacterianos que incluyen, aunque sin limitarse a E. coli, Salmonella thyphimurium, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori, Hemophilus influenzae, Shigella dysenteriae, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis y Streptococcus pneumoniae, agentes fúngicos y parásitos tales como Giardi.

[00175] En forma alternativa, dicho epítope puede unirse a un receptor de Fc (*por ej.*, FcγRI o FcγRII), con el fin de, por ejemplo redirigir las células leucémicas monocíticas agudas en sustratos para lisis celular mediada por células NK.

5.1 DOMINIOS DE UNIÓN DE DIACUERPOS

[00176] Los diacuerpos de la presente invención comprenden dominios de unión a los antígenos que derivan en general de inmunoglobulinas o anticuerpos. Los anticuerpos de los cuales los dominios de unión usados en los métodos de la invención derivan pueden ser de cualquier origen animal que incluyen aves y mamíferos (*por ej.*, humano, primate no humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, cobayo, camello, caballo, o pollo). Con preferencia, los anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados monoclonales. Como se usa en este

documento, anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o bibliotecas de secuencias de codificación de inmunoglobulina humana sintética o del arroz que expresa anticuerpos de genes humanos.

[00177] La invención contempla el uso de cualquier anticuerpo conocido en la materia para el tratamiento y/o prevención del cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria o enfermedad infecciosa como origen de los dominios de unión para los diacuerpos de la invención. Algunos ejemplos no limitativos de anticuerpos conocidos contra el cáncer se proporcionan en la sección 5.7.1 así como también otros anticuerpos específicos para los antígenos de destino mencionados y antígenos de anticuerpos contra el cáncer enumerados en la sección 5.6.1; algunos ejemplos no limitativos ejemplos de anticuerpos conocidos para el tratamiento y/o prevención de enfermedad autoinmune y enfermedad inflamatoria se proporcionan en la sección 5.7.2. así como también anticuerpos contra los antígenos de destino mencionados y anticuerpos contra los antígenos enumerados en la sección 5.6.2; en otras realizaciones pueden usarse anticuerpos contra epítopes asociados con enfermedades infecciosas como se enumera en la sección 5.6.3. En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que se han identificado por medio de los métodos de la invención porque tienen una función efectora conferida y/o afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad reducida por FcγRIIIA con relación a una molécula comparable que comprende una región de Fc de tipo salvaje. Un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que pueden diseñarse de acuerdo con la invención se presenta en la **Tabla 9**, y un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastorno autoinmune se presenta en la **Tabla 10**.

[00178] Para algunos usos, que incluyen el uso *in vivo* de los anticuerpos en humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible el uso de diacuerpos con dominios variables derivados de anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los dominios variables de anticuerpos completamente humanos se desean en particular el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden realizarse por una variedad de métodos conocidos en la materia que incluyen métodos de visualización de fago descritos con anterioridad con el uso de bibliotecas de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también Patentes de EE UU Nros. 4,444,887 y 4,716,111; y Publicaciones Internacionales Nros. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741; cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00179] Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, una variante o un fragmento de los anteriores que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región de marco que tiene en forma sustancial la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina

humana y un CDR que tiene en forma sustancial la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado puede comprender en forma sustancial la totalidad de por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los cuales todas o en forma sustancial la totalidad de las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (*es decir*, anticuerpo donante) la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones de marco son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana.

[00180] Las regiones de CDR y marco de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente a las secuencias de origen, *por ej.*, el CDR donante o el marco de consenso puede mutagenizarse por sustitución, inserción o eliminación de por lo menos un residuo de modo tal que el CDR o residuo de marco en ese sitio no corresponde a ninguno del anticuerpo de consenso o donante. Dichas mutaciones, sin embargo, con preferencia no son extensivos. Usualmente, por lo menos 75% de los residuos de anticuerpo humanizados corresponderán a aquellas de la región de marco de origen (FR) y secuencias de CDR, con mayor frecuencia 90%, y con mayor preferencia más del 95%. Los anticuerpos humanizados pueden producirse con el uso de una variedad de técnicas conocidas en la materia, que incluyen aunque sin limitarse a, injerto de CDR (Patente Europea Nro. EP 239,400; Publicación Internacional Nro. WO 91/09967; y Patentes de EE UU Nros. 5,225,539, 5,530,101, y 5,585,089), recubrimiento o reformación de la superficie (Patentes Europeas Nros. EP 592,106 y EP 519,596; Padlan (1991) *"A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Variable Antibody Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties,"* Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.* (1994) *"Human-Engineered Monoclonal Antibodies Retain Full Specific Binding Activity By Preserving Non-CDR Complementarity-Modulating Residues,"* Proteína Engineering 7(6):805-814; y Roguska *et al.* (1994) *"Humanization Of Murine Monoclonal Antibodies Through Variable Domain Resurfacing,"* Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973), reacomodamiento de cadena (Patente de los EE UU Nro. 5,565,332), y técnicas divulgadas en, *por ej.*, Patentes de EE UU Nros. 6,407,213, 5,766,886, 5,585,089, Publicación Internacional Nro. WO 9317105, Tan *et al.* (2002) *"'Superhumanized' Antibodies: Reduction Of Immunogenic Potential By Complementarity-Determining Region Grafting With Human Germline Sequences: Application To An Anti-CD28,"* J. Immunol. 169:1119-25, Caldas *et al.* (2000) *"Diseño y Synthesis Of Germline-Based Hemi-Humanized Single-Chain Fv Against The CD18 Surface Antigen,"* Proteín Eng. 13:353-60, Morea *et al.* (2000) *"Anticuerpo Modeling: Implications For Engineering And Design,"* Methods 20:267-79, Baca *et al.* (1997) *"Anticuerpo Humanization With the Use of Monovalent Phage Display,"* J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska *et al.* (1996) *"A Comparison Of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized By CDR Graft And Variable Dominio Resurfacing,"* Protein Eng. 9:895-904, Couto *et al.* (1995) *"Designing Human Consensus Antibodies With Minimal Positional Templates,"* Cáncer Res.

55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto *et al.* (1995) *"Anti-BA46 Monoclonal Anticuerpo Mc3: Humanization Using A Novel Positional Consensus And In Vivo And In Vitro Characterization,"* Cáncer Res. 55:1717-22, Sandhu (1994) *"A Rapid Procedure For The Humanization Of Monoclonal Antibodies,"* Gene 150:409-10, Pedersen *et al.* (1994) *"Comparison Of Surface Accessible Residues In Human And Murine Immunoglobulin Fv Dominios. Implication For Humanization Of Murine Antibodies,"* J. Mol. Biol. 235:959-973, Jones *et al.* (1986) *"Replacing The Complementarity-Determining Regions In a Human Antibody With Those From A Mouse,"* Nature 321:522-525, Riechmann *et al.* (1988) *"Reshaping Human Antibodies For Therapy,"* Nature 332:323-327, y Presta (1992) *"Antibody Engineering,"* Curr. Op. Biotech. 3(4):394-398. Con frecuencia, los residuos de marco en las regiones de marco se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo de CDR donante para alterar, con preferencia mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de marco are identified by métodos well conocidos en la materia, *por ej*., por modelado de las interacciones del CDR y los residuos de marco para identificar los residuos de marco importante para unión al antígeno y comparación de la secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, *por ej*., Queen *et al.*, Patente de los EE UU Nro. 5,585,089; Publicaciones de EE UU Nros. 2004/0049014 y 2003/0229208; Patentes de EE UU Nros. 6,350,861; 6,180,370; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; y 5,530,101 y Riechmann *et al.* (1988) *"Reshaping Human Antibodies For Therapy,"* Nature 332:323-327, la totalidad de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en sus totalidades.).

[00181] En una realización más preferida, el dominio de unión humanizado se une en forma específica al mismo epítope que el anticuerpo murino donante. Una persona con experiencia en el arte apreciará que la invención abarca injerto CDR de los anticuerpos en general. De este modo, los anticuerpos donante y receptor puede derivar de animales de la misma especie e incluso la misma clase o sub-clase de anticuerpo. Más usualmente, sin embargo, los anticuerpos donante y receptor derivan de animales de diferentes especies. Normalmente el anticuerpo donante es un anticuerpo no humano, tales como un mAb de roedor y el anticuerpo receptor es un anticuerpo humano.

[00182] En algunas realizaciones, por lo menos un CDR del anticuerpo donante se injerta sobre el anticuerpo humano. En otras realizaciones, por lo menos dos y con preferencia la totalidad de tres CDRs de cada una de las regiones variables de cadena liviana y/o pesada se injertan sobre el anticuerpo humano. Los CDRs pueden comprender los CDRs de Kabat, los CDRs del circuito estructural o una combinación de los anteriores. En algunas realizaciones, la invención abarca un anticuerpo FcγRIIB inmunizado que comprende por lo menos una cadena pesada de injerto de CDR y por lo menos una cadena liviana de injerto de CDR.

[00183] Los diacuerpos usados en los métodos de la invención incluyen derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al diacuerpo. Por

ejemplo, aunque no a modo de limitación, los derivados de diacuerpo incluyen diacuerpos que se han modificado, *por ej.*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por medio de grupos protectores/ de bloqueo conocidos, descomposición proteolítica, ligadura a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, que incluyen, aunque sin limitarse a, descomposición química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. En forma adicional, el derivado puede contener uno o más aminoácidos clásicos.

[00184] Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porcioens del anticuerpo derivan de diferentes moléculasde inmunoglobulina tales como anticuerpos having a región variable derivado de a non-humun anticuerpo and una inmunoglobulina humana constant region. Los métodos for producing anticuerpos quiméricos se conocen en la materia. Véase por ej., Morrison (1985) *"Transfectomes Provide Novel Chimeric Antibodies,"* Science 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *"Chimeric Antibodies,"* BioTechniques 4:214-221; Gillies *et al.* (1989) *"High-Level Expression Of Chimeric Antibodies Using Adapted cDNA Variable Region Cassettes,"* J. Immunol. Methods 125:191-202; y Patentes de EE UU Nros. 6,311,415, 5,807,715, 4,816,567, y 4,816,397, las cuales se incorporan en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00185] Con frecuencia, los residuos de marcos en las regiones de marco se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo de CDR donante para alterar, con preferencia mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican por métodos muy conocidos en la materia, *por ej.*, por modelado de las interacciones del CDR y los residuos de marco para identificar los residuos de marco importante para unión al antígeno y comparación de la secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, *por ej.*, Patente de los EE UU Nro. 5,585,089; y Riechmann *et al.* (1988) *"Reshaping Human Antibodies For Therapy,"* Nature 332:323-327, las cuales se incorporan en este documento a modo de referencia en sus totalidades.)

[00186] Los anticuerpos monclonales de los cuales los dominios de unión de los diacuerpos de la invención pueden prepararse con el uso de una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de visualización de fago, o una combinación de los anteriores. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse con el uso de técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la materia y se enseñan, por ejemplo, en Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (ambos de los cuales se incorporan a modo de referencia en sus totalidades). El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento no se limita a anticuerpos producidos a través de la tecnología de hidriboma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un

clon simple, que incluye cualquier clon eucariótico, procariótico o fago, y no el método por el cual se produce.

[00187] Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos con el uso de la tecnología de hibridoma son de rutina y muy conocidos en la materia. En un ejemplo no limitativo, los ratones pueden inmunizarse con un antígeno de interés o una célula que expresa dicho antígeno. Una vez que se ha detectado la respueta inmunológica, *por ej*., anticuerpos específicos para el antígeno se detectan en el suero de ratón, el bazo del ratón se cosecha y se aíslan los esplenocitos. Luego los esplenocitos se fusionan por técnicas muy conocidas a cualquier célula de mieloma apropiada. Los hibridomas se seleccionan y se clonan limitando la dilución. Los clones de hibridoma luego se evalúan por métodos conocidos en la materia para células que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno. El fluido de ascitis, que en general contiene altos niveles de anticuerpos, puede generarse por inoculación de ratones por vía intraperitoneana con clones de hidridoma positivos. Los antígenos de interés incluyen, aunque no se limitan a, antígenos asociados con los cánceres que se presentan en la sección 5.8.1, antígenos asociados con las enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias presentadas en la sección5.8.2, antígenos asociados con las enfermedades infecciosas provistas en la sección 5.8.3, y las toxinas provistas en la sección 5.8.4.

[00188] También pueden generarse anticuerpos con el uso de various métodos de visualización de fago conocidos en la materia. En los métodos de visualización de fago, los dominios de anticuerpos funcionales se visualizan sobre la superficie de partículas de fago que llevan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, dicho fago puede utilizarse para mostrar dominios de unión a los antígenos, tales como Fab y Fv o Fv estabilizado con unión a disulfuro, expresado a partir de una biblioteca de anticuerpos combinatorios o repertorios (*por ej*., humano o murino). El fago que expresa un dominio que se une al fago que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, *por ej.*, con el uso de antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie o perla sólida. Los fagos usados en estos métodos normalmente son fago filamentosos, que incluyen fd y M13. Los dominios de unión a los antígenos se expresan como proteína fusionada en forma recombinante a cualquiera del gen de fagoIII o la proteína del gen VIII. Algunos ejemplos de métodos de visualización de fago que pueden usarse para hacer las inmunoglobulinas, o fragmentos de los anteriores, de la presente invención incluyen aquellos divulgados en Brinkmann *et al.* (1995) *"Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments,"* J. Immunol. Métodos, 182:41-50; Ames *et al.* (1995) *"Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Inmunoglobulins,"* J. Immunol. Métodos, 184:177-186; Kettleborough *et al.* (1994) *"Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Anticuerpo Libraries And The Re-Construcción de Whole Antibodies From These Anticuerpo Fragments,"* Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic *et al.* (1997) *"An Integrated Vector System*

For The Eukaryotic Expression Of Antibodies o Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries," Gene, 187:9-18; Burton *et al.* (1994) "*Human Antibodies From Combinatorial Libraries,"* Advances in Immunology, 57:191-280; PCT Application No. PCT/GB91/01134; Publicaciones por PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de EE UU Nros. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108; cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00189] La tecnología de visualización de fago puede usarse para aumentar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. Esta técnica sería útil en la obtención de anticuerpos de alta afinidad. La tecnología, denominada maduración por afinidad, emplea mutagénesis o movimiento de CDR y re-selección con el uso del antígeno cognato para identificar anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno cuando compared con el anticuerpo inicial o de origen (Véase, *por ej.*,Glaser *et al.* (1992) *"Dissection Of The Combining Site In an Humanized Anti-Tac Antibody,"* J. Immunology 149:2607-2614). La mutagénesis entre codones en lugar de nucleótidos individuales produce un repertorio aleatorizado de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un pool de clones variantes cada uno de los cuales difiere por una sola alteración en la cadena de aminoácidos en un CDR individual y que contiene variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada residuo de CDR. Los mutantes con mayor afinidad de unión por el antígeno puede seleccionarse por medio del contacto de los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Cualquier método de selección conocido en la materia puede usarse para identificar anticuerpos mutantes con aumento de la avidez al antígeno (*por ej.*, ELISA) (Véase Wu *et al.* (1998) *"Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb,"* Proc Natl. Acad Sci. USA 95:6037-6042; Yelton *et al.* (1995) *"Affinity Maturation Of The Br96 Anti-Carcinoma Anticuerpo By Codon-Based Mutagenesis,"* J. Immunology 155:1994-2004). El movimiento de CDR que radomiza la cadena liviana también es posible (Véase Schier *et al.* (1996) *"Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of Complementarity Determinant Regions In The Center Del anticuerpo Binding Site,"* J. Mol. Bio. 263:551-567).

[00190] La presente invención abarca, además, el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión descritos en este documento o conocidos en la materia con mutaciones (*por ej.*, una o más sustituciones de aminoácidos) en el marco o las regiones de CDR. Con preferencia, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o potencian la avidez y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB a los cuales se unen en forma inmunoespecífica. Las técnicas estándar conocidas por aquellas personas con experiencia en la materia (*por ej.*, inmunoensayos) pueden usarse para evaluar la afinidad de un anticuerpo para un antígeno particular.

[00191] Las técnicas estándar conocidas por aquellas personas con experiencia en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifican un anticuerpo, o fragmento de los anteriores, que incluyen, *por ej.*, mutagénesis orientada al sitio y mutagénesis mediada por PCR, lo cual produce sustituciones de aminoácidos. Con preferencia, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con relación al anticuerpo original o fragmento de los anteriores. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservadores hechas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

5.1.1 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN SITIOS QUE SE UNEN AL EPÍTOPE QUE SE UNEN EN FORMA INMUNOESPECÍFICA AFcγRIIB

[00192] En una realización particular, por lo menos uno de los dominios de unión de los diacuerpos de la invención agoniza por lo menos una actividad de FcγRIIB. En una realización de la invención, dicha actividad es la inhibición de señalización mediada por el receptor de células B. En otra realización, el dominio de unión inhibe activación de células B, proliferación de las células B, producción de anticuerpos, influjo de calcio intracelular de células B, progresión del ciclo de las células, o actividad de una o más moléculas de señalización descendente en la vía de transducción de señal de FcγRIIB. Incluso en otra realización, el dominio de unión potencia la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la invención, el dominio de unión inhibe la actividad de quinasa MAP o reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de células B. En otra realización, el dominio de unión agoniza la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una realización particular, dicho dominio de unión inhibe la activación de mastocitos inducida por FcεRI, movilización del calcio, desgranulación, producción de citoquinas, o liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión de la invención estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, o inhiben la activación de miembros de la familia de quinasa MAP (*por ej*., Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). Incluso en otra realización, los dominios de unión de la invención potencian la fosforilación de tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión de la invención inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

[00193] En otra realización, los dominios de unión antagonize por lo menos una actividad de FcγRIIB. En una realización, dicha actividad es activación de señalización mediada por el receptor de células B. En una realización particular, los dominios de unión potencian la actividad de las células B, proliferación de las células B, producción de anticuerpos, intracellular calcium influx, o actividad de una o más moléculas de señalización descendente

en la vía de transducción de señal de FcγRIIB. Incluso otra realización particular, los dominios de unión reducen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la invención, los dominios de unión potencian la actividad de quinasa o reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de células B. En otra realización, los dominios de unión antagonize la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una realización particular, los dominios de unión enhance la activación de mastocitos inducida por FcεRI, movilización del calcio, desgranulación, producción de citoquinas, o liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de y su asociación con Shc, potencian la activación de miembros de la familia de quinasa MAP (*por ej.*, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). Incluso en otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación de tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión potencan la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otra realización, los dominios de unión previenen la fagocitosis, depuración de partículas opsonizadas por macrófagos esplénicos.

[00194] En otras realizaciones, por lo menos uno de los dominios de unión pueden usarse para dirigir los diacuerpos de la invención a células que expresan FcγRIIB.

[00195] En una realización particular, uno de los dominios de unión deriva de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7, que tiene números de acceso a ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Los hibridomas que producen los anticuerpos 2B6 y 3H7 se han depositado en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 bajo las disposiciones del tratado de Budapest on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedures, y recibieron los números de acceso PTA-4591 (para producir el hibridoma 2B6) y PTA-4592 (para producir el hibridoma 3H7), respectivamente, y se incorporan en este documento a modo de referencia. En una realización preferida, los dominios de unión son humanos o se han humanizado, con preferencia derivan de una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6.

[00196] La invención abarca, además, los diacuerpos con dominios de unión a partir de otros anticuerpos, que se unen en forma específica a FcγRIIB, con preferencia FcγRIIB humano, con mayor preferencia FcγRIIB humana nativa, que derivan de clones que incluyen aunque sin limitarse a 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tiene números de acceso a ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas que producen los clones identificados con anterioridad se depositaron bajo las disposiciones del tratado de Budapest con el American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004, y se incorporan en este documento a modo de referencia. En realizaciones preferidas, los dominios de unión de los anticuerpos descritos con anterioridad, son inmunizados.

[00197] En una realización específica, los dominios de unión usados en los diacuerpos de la presente invención son de un fragmento que se une al anticuerpo o antígeno de los anteriores (*por ej*., que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), con preferencia la totalidad de los 6 CDRs) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. En otra realización, el dominio de unión se une al mismo epítope que el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, respectivamente y/o compite con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 según se determina, *por ej*., en an ensayo ELISA o otro inmunoensayo competitivo apropiado, y además se une a FcγRIIB con una mayor afinidad que el dominio de unión se une a FcγRIIA.

[00198] La presente invención abarca, además, los diacuerpos con dominios de unión que comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena variable pesada y/o cadena variable liviana que es por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena variable pesada y/o cadena liviana del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. La presente invención abarca, además, los diacuerpos con dominios de unión que se unen en forma específica a FcγRIIB con mayor afinidad que dicho anticuerpo o fragmento de los anteriores se une a FcγRIIA, y que comprenden una secuencia de aminoácidos de one o más CDRs que es por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de uno o más CDRs del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos pueden determinarse por cualquier método conocido por los expertos en el arte, que incluyen búsquedas de proteínas por BLAST.

[00199] La presente invención abarca, además, el uso de diacuerpos que contienen dominios de unión que se unen en forma específica a FcγRIIB con mayor afinidad que dominio de unión se une a FcγRIIA, los cuales están codificados por una secuencia de nucleótidos que se hibrida a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 en condiciones rigurosas. En una realización preferida, el dominio de unión se une en forma específica a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprende una cadena variable liviana y/o cadena variable pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de la cadena variable liviana y/o cadena variable pesada del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 en condiciones rigurosas. En otra realización preferida, los dominios de unión se unen en forma

específica a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprenden uno o más CDRs codificados por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de uno o más CDRs del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, aunque no se limitan a, hibridación al ADN adherido al filtro en citrato de sodio/ cloruro de sodio 6X (SSC) a alrededor de 45°C seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC/0,1% SDS a alrededor de 50-65°C, condiciones altamente rigurosas tales como hibridación al ADN adherido al filtro en SSC 6X a alrededor de 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC/0,2% SDS a alrededor de 60°C, o cualquier otra condición de hibridación rigurosa conocida por aquellas personas expertas en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al.*, eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2,10,3, incorporadas aquí a modo de referencia).

[00200] La presente invención abarca, además, el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión descritos con anterioridad con mutaciones (*por ej.*, una o más sustituciones de aminoácidos) en el marco o las regiones de CDR. Con preferencia, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o potencian la avidez y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB a los cuales se unen en forma inmunoespecífica. Las técnicas estándar conocidas por aquellas personas con experiencia en la materia (*por ej.*, inmunoensayos) pueden usarse para evaluar la afinidad de un anticuerpo para un antígeno particular.

[00201] Las técnicas estándar conocidas por aquellas personas con experiencia en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifican un anticuerpo, o fragmento de los anteriores, que incluyen, *por ej.*, mutagénesis orientada al sitio y mutagénesis mediada por PCR, lo cual produce sustituciones de aminoácidos. Con preferencia, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con relación al anticuerpo original o fragmento de los anteriores. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservadores hechas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

[00202] En realizaciones preferidas, los dominios de unión derivan de anticuerpos humanizados. Un anticuerpo específico de FcγRIIB humanizado puede comprender en forma sustancial la totalidad de por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los cuales todas o en forma sustancial la totalidad de las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (*es decir*, anticuerpo donante) la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones de marco son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana.

[00203] Los diacuerpos de la presente invención comprenden dominios variables específicos humanizados para FcγRIIB en los cuales una o más regiones de uno o más CDRs de las regiones variables de cadena liviana y/o pesada de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) se ha sustituido por partes análogas de uno o más CDRs de un anticuerpo monoclonal donante que se une en forma específica a FcγRIIB, con una mayor afinidad que FcγRIIA, *por ej.*, un anticuerpo monclonal producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados se unen al mismo epítope que 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, respectivamente.

[00204] En una realización preferida, las regiones de CDR del dominio de unión FcγRIIB humanizado derivan de un anticuerpo murino específico para FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en este documento comprenden alteraciones, que incluyen aunque sin limitarse a eliminaciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos, del anticuerpo receptor, *es decir*, regiones de marco de dominio variable de cadena liviana y/o pesada, humanas que son necesarias para retener la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donante. En algunas realizaciones, las regiones de marco de los anticuerpos humanizados descritos en este documento no necesariamente consiste en la secuencia precisa de aminoácidos de the región de marco de una región variable del anticuerpo humano natural, sino que contiene varias alteraciones, que incluyen aunque sin limitarse a eliminaciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejoran las propiedades de unión de un anticuerpo humanizado region que es específico para el mismo objetivo que el anticuerpo específico murino FcγRIIB. En las realizaciones más preferidas, una cantidad mínima de alteraciones se realizan a la región de marco con el fin de evitar introducciones a gran escala de residuos de marco no humanos y asegurar la inmunogenicidad mínima del anticuerpo inmunizado en humanos. El anticuerpo monoclonal donante es con preferencia un anticuerpo monclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2.

[00205] En una realización específica, el dominio de unión abarca dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une en forma específica a FcγRIIB con una mayor afinidad que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, en donde el anticuerpo con injerto CDR comprende a cadena pesada región variable dominio que comprende residuo de marcos of el anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donante, que se une en forma específica a FcγRIIB con una mayor afinidad que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, *por ej.*, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. En otra realización específica, los diacuerpos de la invención comprenden dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une en forma específica a FcγRIIB con una mayor afinidad que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, en donde el anticuerpo con injerto CDR comprende a cadena liviana región variable dominio que comprende residuo de marcos of el anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donante, que se une en forma

específica a FcγRIIB con una mayor afinidad que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, *por ej*., anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2.

[00206] Los dominios variables anti- FcγRIBB humanizados usados en la invención pueden tener una cadena pesada región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 **(SEC ID NRO.: 24 o SEC ID NRO.: 25)** y/o CDR2 **(SEC ID NRO.: 26 o SEC ID NRO.: 27)** y/o CDR3 **(SEC ID NRO.: 28 o SEC ID NRO.: 29)** y/o una cadena liviana región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 **(SEC ID NRO.: 30 o SEC ID NRO.: 31)** y/o a CDR2 **(SEC ID NRO.: 32, SEC ID NRO.: 33, SEC ID NRO.: 34, o SEC ID NRO.: 35)** y/o CDR3 **(SEC ID NRO.: 36 o SEC ID NRO.: 37)**.

[00207] En una realización específica, el diacuerpo comprende dominios variables de un anticuerpo 2B6 humanizado, en donde la región VH consiste en los fragmentos FR del segmento VH de la línea germinal humana VH1-18 (Matsuda *et al.* (1998) *"The Complete Nucleotide Sequence Of The Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus,"* J. Exp. Med. 188:2151-2162) and JH6 (Ravetch *et al.* (1981) *"Structure Of The Human Immunoglobulin Mu Locus: Caracterización de Embryonic And Rearranged J And D Genes,"* Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones de CDR del 2B6 VH, que tiene la secuencia de aminoácidos de **SED ID NO:24**, **SEC ID NRO.: 26**, o **SEC ID NRO.: 28**. En una realización, el 2B6 VH tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO.: 38**. En otra realización el dominio 2B6 VH tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VH, **SEC ID NRO.: 85**, y puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de la **SEC ID NRO.: 86**. En otra realización específica, el diacuerpo comprende, en forma adicional, una región VL, que consiste en los segmentos FR del segmento VL de la línea germinal humana VK-A26 (Lautner-Rieske *et al.* (1992) *"The Human Immunoglobulin Kappa Locus. Caracterización de The Duplicated A Regions,"* Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) and JK4 (Hieter *et al.* (1982) *"Evolution Of Human Immunoglobulin Kappa J Region Genes,"* J. Biol. Chem. 257:1516-22), y una o más regiones de CDR of 2B6VL, que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEC ID NRO.: 30, SEC ID NRO.: 32, SEC ID NRO.: 33, SEC ID NRO.: 34**, y **SEC ID NRO.: 36**. En una realización, el 2B6 VL tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEC ID NRO.: 39; SEC ID NRO.: 40, o SEC ID NRO.: 41**. En una realización específica, el 2B6 VL tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VL, **SEC ID NRO.: 87**, y puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos provista en la **SEC ID NRO.: 88**.

[00208] En otra realización específica, el diacuerpo tiene dominios variables de un anticuerpo 3H7 humanizado, en donde la región VH consiste en los fragmentos FR de un segmento VH de la linea germinal humana y las regiones de CDR del 3H7 VH, que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO.. 35.** En otra realización específica, the humanized 3H7 anticuerpo comprende, en forma adicional, una región VLs, que consiste en los segmentos FR

de un segmento VL de línea germinal humana y las regiones de CDR de 3H7VL, que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO.: 42**.

[00209] En particular, dominios de unión inmunológica se unen en forma específica a dominios extracelulares de FcγRIIB humano nativo, y comprenden (o en forma alternativa, consisten en) secuencias de CDR de 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, en cualquiera de las siguientes combinaciones: un VH CDR1 y un VL CDR1; un VH CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR2 y un VL CDR1; VH CDR2 y VL CDR2; un VH CDR2 y un VL CDR3; un VH CDR3 y un VH CDR1; un VH CDR3 y un VL CDR2; un VH CDR3 y un VL CDR3; un VH1 CDR1, un VH CDR2 y un VL CDR1; un VH CDR1, un VH CDR2 y un VL CDR2; un VH CDR1, un VH CDR2 y un VL CDR3; un VH CDR2, un VH CDR3 y un VL CDR1, un VH CDR2, un VH CDR3 y un VL CDR2; un VH CDR2, un VH CDR2 y un VL CDR3; un VH CDR1, un VL CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR1, un VL CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR2, un VL CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR2, un VL CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR1, un VH CDR2, un VH CDR3 y un VL CDR1; un VH CDR1, un VH CDR2, un VH CDR3 y un VL CDR2; un VH CDR1, un VH CDR2, un VH CDR3 y un VL CDR3; un VH CDR1, un VH CDR2, un VL CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR1, un VH CDR2, un VL CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR1, un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR1, un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR2, un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR2, un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR2, un VH CDR3, un VL CDR2 y un VL CDR3; un VH CDR1, un VH CDR2, un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR2; un VH CDR1, un VH CDR2, un VH CDR3, un VL CDR1 y un VL CDR3; un VH CDR1, un VH CDR2, un VL CDR1, un VL CDR2, y un VL CDR3; un VH CDR1, un VH CDR3, un VL CDR1, un VL CDR2, y un VL CDR3; un VH CDR2, un VH CDR3, un VL CDR1, un VL CDR2, y un VL CDR3; o cualquiera de las combinaciones de los anteriores de los VH CDRs y VL CDRs divulgados en este documento.

[00210] Los anticuerpos para derivar los dominios de unión que se incluirán en los diacuerpos de la invención pueden caracterizarse en forma adicional por mapeo de epítopes, de modo tal que puedan seleccionarse anticuerpos que tengan la mayor especificidad por FcγRIIB cuando se compara con FcγRIIA. Los métodos de mapeo de epítopes de los anticuerpos se conocen muy bien en la materia y se abarcan dentro de los métodos de la invención. En ciertas realizaciones proteínas de fusión que comprende una o más regiones de FcγRIIB pueden usarse en el trazado del mapa del epítope de un anticuerpo de la invención. En una realización específica, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionada a una porción Fc de IgG2 humana. Cada proteína de fusión puede comprender en forma adicional sustituciones de aminoácidos y/o reemplazos de ciertas regiones del receptor con la región correspondiente de un receptor homólogo, *por ej.*,

FcγRIIA, como se muestra en la Tabla 2 a continuación. pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión de IgG del receptor de FcγRIBB, el primero con el extremo terminal C de FcγRIBB y el último con el extremo terminal C de FcγRIIA y puede usarse para diferenciar la unión al extremo terminal C. Los otros tienen sustituciones de FcγRIIA en el sitio de unión de IgG y cualquiera del extremo terminal N de FcγIIA o FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula del receptor donde se unen los anticuerpos.

Tabla 2. Lista de las proteínas de fusión que pueden usarse para investigar el epítope de los anticuerpos anti-FcγRIIB monoclonales. Los residuos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión de IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia de FcγRIIA están en negrita.

Plásmido	Receptor	Extremo Terminal N	172-180	SEC ID NRO.:	Extremo Terminal C
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	43	APS------SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	**Q**KFSR**L**DPN	44	APS------SS (IIb)
pMGX127		IIa	**Q**KFSR**L**DP**T**	45	APS------SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSR**L**DP**T**	46	APS------SS (IIb)
pMGX129		IIa	**Q**KFS**HL**DP**T**	47	APS------SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFS**HL**DP**T**	48	APS------SS (IIb)
pMGX131		IIa	**Q**KFSR**L**DPN	49	VPSMGSSS(IIa)
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	50	VPSMGSSS(IIa)
pMGX133	RIIa-131R	IIa	**Q**KFSR**L**DP**T**	51	VPSMGSSS(IIa)
pMGX134	RIIa-131H	IIa	**Q**KFS**HL**DP**T**	52	VPSMGSSS(IIa)
pMGX135		IIb	KKFSR**L**DP**T**	53	VPSMGSSS(IIa)
pMGX136		IIb	KKFS**HL**DP**T**	54	VPSMGSSS(IIa)
Nota: APSSS es la **SEC ID NRO.: 309**; VPSMGSSS es la **SEC ID NRO.: 310**					

[00211] Las proteínas de fusión pueden usarse en cualquier ensayo bioquímico para la determinación de unión a un anticuerpo anti FcγRIIB de la invención, *por ej.*, un ELISA. En otras realizaciones, la confirmación adicional de la especificidad por el epítope puede realizarse por medio del uso de péptidos con residuos específicos reemplazados con aquellos de la secuencia FcγRIIA.

[00212] Los anticuerpos pueden caracterizarse con el uso de ensayos para identificar la función de los anticuerpos de la invención, en particular la actividad de modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización de la invención pueden medir la fosforilación de los residuos de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización del calcio generada or el receptor de células B. Los ensayos de caracterización de la invención pueden ser ensayos basados en células o líbres de células.

[00213] Se ha establecido muy bien en la materia que en la co-agregación de mastocitos de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, conduce a la inhyibición de la desgranulación inducida por antígenos, movilización del calcio, y producción de citoquinas (Metcalfe D.D. *et al.* (1997) *"Mastocytes,"* Physiol. Rev. 77:1033-1079; Long E.O. (1999) *"Regulation Of Immune Responses Through Inhibitory Receptors,"* Annu. Rev. Immunol. 17: 875-904). Los detalles moleculares de esta vía de señalización se han elucidado recientemente (Ott V. L. (2002) *"Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling,"* J. Immunol. 162(9):4430-4439). Una vez coagregado con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente sobre la tirosina en su motivo de ITIM, y luego recluta Src Homology-2 que contiene inositol-5-fosfatasa (SHIP), una 5-fosfatasa de inositol polifosfato que contiene un dominio SH2, que a su vez se fosforila y se asocia con Shc y $p62^{dok}$ ($p62^{dok}$ es el prototipo de una familia de moléculas adaptadora, que incluye dominios de señalización tales como un dominio de homología de plecstrina aminoterminal (PH domain), un dominio de PTB, y una región terminal carboxi que contiene motivos PXXP y numerosos sitios de fosforilación (Carpino *et al.* (1997) "p62(dok): A Constitutively Tyrosine-Phosphorilated, GAP-Associated Proteína In Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells," Cell, 88: 197-204; Yamanshi *et al.* (1997) *"Identification Of The Abl- And rasGAP-Associated 62 kDa Protein As A Docking Protein, Dok,"* Cell, 88:205-211).

[00214] Los anticuerpos anti-FcγRIIB para usar en la invención pueden caracterizarse del mismo modo para determinar la capacidad de modular una o más respuestas mediadas por IgE. Con preferencia, las líneas celulares que co-expresan el receptor con alta afinidad de IgE y el receptor de bja afinidad por FcγRIIB se usará en la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB en la modulación de las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, se usarán las células de una línea celular de leucemia basofílica de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al.* (1981) *"IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones,"* Eur. J. Immunol, 11:317-323, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad) transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa. RBL-2H3 es una línea celular de rata bien caracterizada que se ha usado extensivamente para estudiar los mecanismos de señalización que siguen a la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL -2H3 y coagregado con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización del calcio inducida por FcεRI, desgranulación, y producción de citoquinas (Malbec *et al.* (1998) *"Fc Epsilon Receptor I-Associated Lyn-Dependent Fosforilation Of Fc Gamma Receptor IIB During Negative Regulation Of Mastocyte Activation,"* J. Immunol. 160:1647-1658; Daeron *et al.* (1995) *"Regulation Of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mastocyte Activation By Murine Low-Affinity IgG Receptors,"* J. Clin. Invest. 95:577; Ott V. L. (2002) *"Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling,"* J. Immunol. 162(9):4430-4439).

[00215] Los anticuerpos para usar en la invención también pueden estar caracterizados para la inhibición de activación de mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, las células de una línea celular de leucemia basofílica de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al.* (1981) *"IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones,"* Eur. J. Immunol,11:317-323) que se han transfectado con FcγRIIB se sensibilizan con IgE y se estimulan en forma indistinta con fragmentos $F(ab')_2$ de IgG anti-ratón de conejo, para agregar FcεRI solo, o con IgG anti-ratón de conejo completo para coagregar FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de moléculas de señalización descendente puede evaluarse luego de la incorporación de los anticuerpos de la invención a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, la fosforilación de tirosina de FcγRIIB reclutamiento y fosforilación de SHIP, activación de miembros de la familia de quinasa MAP, que incluyen aunque sin limitarse a Erk1, Erk2, JNK, o p38; y la fosforilación de tirosina de $p62^{dok}$ y su asociación con SHIP y RasGAP puede evaluarse.

[00216] Un ensayo ejemplificativo para determinar la inhibición de activación de mastocitos inducida por FcεRI por los anticuerpos de la invención pueden incluir los siguientes: transfectar las células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células RBL-H23 con IgE; estimular células RBL-H23 con cualquiera de $F(ab')_2$ de IgG anti-ratón de conejo (para agregar FcεRI solo y generar la señalización mediada por FcεRI, como control), o estimular células RBL-H23 con IgG anti-ratón de conejo completo (para coagregar FcγRIIB y FcεRI, lo que produce inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que se han estimulado con anticuerpos IgG anti-ratón de conejo completo puede pre-incubarse en forma adicional con los anticuerpos de la invención. La medición de la actividad de FcεRI de las células que se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención y células que no se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención, y que compara niveles de actividad dependiente de FcεRI en estas células, indicarían una modulación de actividad dependiente de FcεRI por los anticuerpos de la invención.

[00217] El ensayo ejemplificativo descrito con anterioridad puede usarse por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloquean la unión de ligandos (IgG) un receptor de FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI por medio de la prevención de la co-agregación de FcγRIIB y FcεRI. Este ensayo del mismo modo identifica anticuerpos que potencian la co-agregación de FcγRIIB y FcεRI y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI al promover la co-agregación de FcγRIIB y FcεRI.

[00218] En algunas realizaciones, los diacuerpos anti-FcγRIIB, que comprenden los dominios de unión de epítopes de anticuerpos anti-FcγRIIB identificados descritos en este documento o conocidos en la materia, de la invención se caracterizan por su capacidad de modular una respuesta mediada por IgE por medio del monitoreo y/o la medición de la desgranulación de mastocitos o basófilos, con preferencia en un ensayo basado en células. Con preferencia,

mastocitos o basófilos para usar en dichos ensayos se han diseñado para contener FcγRIIB humano con el uso de métodos recombinantes estándar conocidos por los expertos en el arte. En una realización específica los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención se caracterizan por su capacidad de modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa basada en células (enzima contenida en los gránulos). La liberación de β-hexosaminidasa de los mastocitos y basófilos es un evento primario en la afección inflamatoria y alérgica aguda (Aketani *et al.* (2001) *"Correlation Between Cytosolic Calcium Concentration And Desgranulation In RBL -2H3 Cells In The Presence Of Various Concentrations Of Antigen-Specific IgEs,"* Immunol. Lett. 75: 185-189; Aketani *et al.* (2000) *"A Screening Method For Antigen-Specific IgE con el uso de Mastocitos Based On Intracellular Calcium Signaling,"* Anal. Chem. 72: 2653-2658). Release of other inflammatory mediators que incluyen aunque sin limitarse a serotonin and histamine may be assayed to measure una respuesta mediada por IgE de acuerdo con los métodos de la invención. Aunque sin intención de ligarse a un mecanismo de acción particular, liberación de los gránulos tales como aquellos que contienen β-hexosaminidasa de los mastocitos y basófilos es un proceso dependiente de la concentración de calcio intracelular que se inicia por el entrecruzamiento de FcγRIs con antígeno multivalente.

[00219] La habilidad de estudiar mastocitos humanos se ha limitado por la ausencia de cultivos de mastocitos humanos a largo plazo apropiados. Recientemente dos nuevas líneas de mastocitos humanos que dependen del factor de células cebada, designadas LAD 1 y LAD2, se establecieron de aspiraciones de médula ósea de un paciente con sarcoma de mastocito/leucemia (Kirshenbaum *et al.* (2003) *"Caracterización de Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mastocyte Lines LAD 1 y 2 Established From a Patient With Sarcoma de mastocito/leucemia; Activation Following Aggregation Of FcRI o FcγRI,"* Leukemia research, 27:677-82, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.). Ambas líneas celulares se han descrito para expresar FcεRI y varios marcadores de mastocitos humanos. Las células LAD 1 y 2 pueden usarse para evaluar el efecto de los anticuerpos de la invención sobre respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, los ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basado en células tales como las que se describieron con anterioridad pueden usarse en células LAD para determinar cualquier modulación de la respuesta mediada por IgE por medio de los anticuerpos anti-FcγRIBB de la invención. En un ensayo ejemplificativo, los mastocitos humanos, *por ej.*, LAD 1, se ceban con anti-nitrofenol de IgE humana quimérica (NP) y se provocan con BSA-NP, el antígeno polivalente, y la desgranulación celular se monitorea por la medición de β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante (Kirshenbaum *et al.* (2003) *"Caracterización de Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mastocyte Lines LAD 1 y 2 Established From a Patient With Mastocyte Sarcoma /Keukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI o FcγRI,"*

Leukemia research, 27:677-82, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.).

[00220] En algunas realizaciones, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, según se determina con el uso de métodos estándar conocidos en la materia, *por ej.*, tintura de FACS, puede ser difícil monitorear y/o detectar diferencias en la activación de la vía de inhibición mediada por los diacuerpos anti-FcγRIIB de la invención. La invención abarca de este modo métodos alternativos, por lo cual la expresión de FcγRIIB puede regularse en forma ascendente con el uso de citoquinas y condiciones de crecimiento particulares. FcγRIIB se ha descrito por ser altamente regulado hacia arriba en líneas celulares de monocitos humanos, *por ej.*, THP1 y U937, (Tridandapani *et al.* (2002) *"Regulated Expresión y Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells,"* J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop *et al.* (2001) *"Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocitos By Th1 and Th2 Cytokines,"* J. of Immunol., 166: 531-537) por IL4. La diferenciación de células U937 con AMP cíclico de dibutirilo has been described to increase expression of FcγRII (Cameron *et al.* (2002) *"Differentiation Of The Human Monocyte Cell Line, U937, Con Dibutyryl CyclicAMP Induces The Expression Of The Inhibitory receptor de Fc, FcgammaRIIB,"* Immunology Letters 83, 171-179). De este modo, la expresión endógena de FcγRIIB en mastocitos humanos para usar en los métodos de la invención puede regularse hacia arriba con el uso de citoquinas, *por ej.*, IL-4, IL-13, con el fin de potenciar la sensibilidad de detección.

[00221] Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden evaluarse para determinar la inhibición de la señalización mediada por el receptor de células B (BCR). la señalización mediada por BCR puede incluir por lo menos una o más respuestas biológicas descendentes, tales como activación y proliferación de células B, producción de anticuerpos, etc. La co-agregación de FcγRIIB y BCR conduce a la inhibición de la progresión del ciclo de las células y la sobrevida celular. Además, la co-agregación de FcγRIIB y BCR conduce a la señalización de señalización mediada por BCR.

[00222] Específicamente, la señalización mediada por BCR comprende por lo menos uno o más de los siguientes: modulación de moléculas de señalización desdcendente (*por ej.*, estado de fosforilación de FcγRIIB, el reclutamiento de SHIP, localización de Btk y/o PLCγ, actividad de quinasa MAP, reclutamiento de Akt (señal anti-apoptótica), movilización del calcio, progresión del ciclo de las células, y proliferación celular.

[00223] Aunque numerosas funciones de la inhibición mediada por la señalización de FcγRIIB de BCR están mediadas a través de SHIP, recientemente se ha demostrado que las células B activadas por lipopolisacárido (LPS) de ratones con deficiencia de SHIP exhiben significativa inhibición mediada por FcγRIIB de movilización del calcio, producción de $Ins(1,4,5)P_3$, y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler *et al.* (2001) *"Partially Distinct*

Molecular Mechanisms Mediate Inhibitory FcgammaRIIB Signaling In Resting And Activated B Cells," Journal of Immunology, 167(1): 204-211). De acuerdo con lo anterior, células B ex vivo de ratones con deficiencia de SHIP pueden usarse para caracterizar los anticuerpos de la invención. Un ensayo ejemplificativo para determinar la señalización de la inhibición mediada por FcγRIIB de BCR por los anticuerpos de la invención pueden comprender los siguientes: aislar células B de bazo de ratones con deficiencia de SHIP, activar dichas células con lipopolisacárido, y estimular dichas células con cualquiera de $F(ab')_2$ anti-IgM para agregar BCR o con anti-IgM para co-agregar BCR con FcγRIIB. Las células que se han estimulado con anti-IgM intacta para coagregar BCR con FcγRIIB puede pre-incubarse en forma adicional con los anticuerpos de la invención. La actividad dependiente de FcγRIIB de las células puede medirse por técnicas estándar conocidas en la materia. Al comparar el nivel de la actividad dependiente de FcγRIIB en células que se han pre-incubado con los anticuerpos y células que no se han pre-incubado, y comparar los niveles se indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por medio de los anticuerpos.

[00224] La medición de la actividad dependiente de FcγRIIB puede incluir, por ejemplo, medir la movilización intracelular del calcio por citometría de flujo, medir la fosforilación de Akt y/o Erk, medir la acumulación mediada por BCR de $PI(3,4,5)P_3$, o medir la proliferación de céluals B mediada por FcγRIIB.

[00225] Los ensayos pueden usarse, por ejemplo, para identificar diacuerpos o anti-FcγRIIB anticuerpos para usar en la invención que modulan la señalización de la inhibición mediada por FcγRIIB de BCR mediante el bloqueo del sitio de unión al ligando (IgG) al receptor de FcγRIIB y antagonizar la señalización de la inhibición mediada por FcγRIIB de BCR mediante la prevención de la co-agregación de FcγRIIB y BCR. Los ensayos también pueden usarse para identificar los anticuerpos que potencian la co-agregación de FcγRIIB y BCR y agonizan la señalización de la inhibición mediada por FcγRIIB de BCR.

[00226] Los anticuerpos anti-FcγRIIB también pueden analizarse para determinar la señalización mediada por FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La co-agregación de FcγRIIB con un receptor que lleva el motivo de activación basado en tirosina inmunosupresora (ITAM) actúa para regular hacia abajo, la fagocitosis mediada por FcγR con el uso de SHIP como su efector (Tridandapani *et al.* (2002) *"Regulated Expresión y Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells,"* J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). La co-agregación de FcγRIIA con FcγRIIB produce rápida fosforilación del residuo de tirosina sobre el motivo ITIM de FcγRIIB, lo que conduce a una potenciación en la fosforilación de SHIP, asociación de SHIP con Shc, y fosforilación de las proteínas que tienen el peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la co-agregación de FcγRIIA con FcγRIIB produce la regulación hacia abajo de la fosforilación de Akt, que es una quinasa de serina-treonina que se ilvolucra en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

[00227] Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden evaluarse para determinar la inhibición de fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, las células de una línea celular monocítica humana, THP-1 puede estimularse indistintamente con fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 contra FcγRII y anticuerpo anti-ratón de cabra (para agregar FcγRIIA solo), o con anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 completo y un anticuerpo anti-ratón de cabra (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB). En este sistema, la modulación de moléculas de señalización desdcendente, tales como la fosforilación de tirosina de FcγRIIB, fosforilación of SHIP, asociación de SHIP con Shc, fosforilación de Akt, y fosforilación de las proteínas que tienen el peso molecular de 120 y 60-65 kDa puede evaluarse luego de la incorporación de moléculas de la invención a las células estimuladas. Además, la eficiencia fagocítica dependiente de FcγRIIB de la línea celular monocítica puede medirse directamente en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención.

[00228] Otro ensayo ejemplificativo para determinar la inhibición de fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos por los anticuerpos de la invención pueden comprender los siguientes: estimular células THP-1 con cualquier Fab de un anticuerpo anti-FcγRII de ratón IV.3 y un anticuerpo anti-ratón de cabra (para agregar FcγRIIA solo y generar la señalización mediada por FcγRIIA); o con anticuerpo anti-FcγRII de ratón y un anticuerpo anti-ratón de cabra (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por FcγRIIA. Las células que se han estimulado con anticuerpo anti-FcγRII de ratón y un anticuerpo anti-ratón de cabra puede pre-incubarse en forma adicional con las moléculas de la invención. La medición de la actividad dependiente de FcγRIIA de células estimuladas que se han pre-incubado con moléculas de la invención y células que no se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcγRIIA en estas células indicarían una modulación de actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención.

[00229] El ensayo ejemplificativo descrito puede usarse por ejemplo, para identificar dominios de unión que bloquea la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA mediante la prevención de la co-agregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Este ensayo del mismo modo identifica dominios de unión que potencian la co-agregación de FcγRIIB y FcγRIIA y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

[00230] Los dominios de unión de FcγRIIB de interés pueden evaluarse mientras que incluían los anticuerpos I por medición de la capacidad de las células THP-1 de opsonizar glóbulos rojos de oveja de IgG con fagocitosa fluoresceína (SRBC) por métodos descritos con anterioridad (Tridandapani *et al.* (2000) "*The Adapter LAT Protein Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells,"* J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ejemplificativo para medir la fagocitosis comprende: tratar las células THP-1 con los anticuerpos de la invención o con un anticuerpo de control que no se une a

FcγRII, que compara los niveles de actividad de dichas células, en donde una diferencia en las actividades de las células (*por ej.*, actividad de acumulación en rosetas (la cantidad de células THP-1 que se unen a SRBC recubierto con IgG), actividad de adherencia (el número total de SRBC unido a células THP-1), e índice fagocítico) indicarían una modulación de actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención. Este ensayo puede usarse para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloquean la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de fagocitosis. Este ensayo puede identificar también anticuerpos que potencian la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

[00231] En una realización preferida, los dominios de unión modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos en por lo menos uno o más de los siguientes modos: modulación de las moléculas de señalización descendiente (*por ej*., modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación de fosforilación de SHIP, modulación de SHIP y asociación de Shc, modulación de fosforilación de Akt, modulación de fosforilación de proteínas adicionales alrededor de 120 y 60-65 kDa) y modulación de fagocitosis.

5.1.2 DOMINIOS DE UNIÓN DE CD16A

[00232] La siguiente sección discute proteínas de unión a CD16A que pueden usarse como fuentes para regiones variables de cadena liviana y pesada para la producción de diacuerpo covalente. En la presente invención las proteínas de unión a CD16A incluye moléculas que comprenden los dominios VL y VH de anticuerpos anti-CD16A, cuyos dominios VH y VL se usan en la producción de los diacuerpos de la presente invención.

[00233] Una variedad de proteínas de unión a CD16A pueden usarse en conexión con la presente invención. Las proteínas apropiadas de unión a CD16A incluyen anticuerpos monoclonales humanos o humanizados así como también fragmentos de anticuerpo que se unen a CD16A (por ej., scFv o anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, minicuerpos) y otras proteínas con aspecto de anticuerpo que se unen a CD16A por medio de una interacción con un dominio variable de región de cadena liviana, un dominio variable de región de cadena pesada, o ambos.

[00234] En algunas realizaciones, la proteína que se une a CD16A para usar de acuerdo con la invención comprende un dominio VL y/o VH que tiene uno o más CDRs con sequences derivado de un anticuerpo anti-CD16A no humano, tales como un anticuerpo anti-CD16A de ratón, y una o más regiones de marco con derivado de secuencias de marco de una o más inmunoglobulinas humanas. Una cantidad de anticuerpos anti-CD16A monoclonales no humanos, de los cuales la CDR y otras secuencias pueden obtenerse, se conocen (véase, por ej., Tamm *et al.* (1996) "*The Binding Epítopes Of Human CD16 (Fc gamma RIII) Monoclonal Antibodies. Implications For Ligand Binding,"* J. Imm. 157:1576-81; Fleit *et al.* (1989) p,159; LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC

CELLS, Reinherz *et al.*, eds. New York: Springer-Verlag; (1986); LEUCOCYTE TYPING III: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS McMichael A J, ed., Oxford: Oxford University Press, 1986); LEUKOCYTE TYPING IV: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kapp et al., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Schlossman et al., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kishimoto, ed. Taylor & Francis. Además, como se muestra en los Ejemplos, nuevas proteínas de unión a CD16A que reconocen CD16A humano expresado en células puede obtenerse con el uso de métodos muy conocidos para la producción y selección de anticuerpos monoclonales o proeínas de unión relacionadas (por ej., la tecnología de hibridoma, visualización de fago, y similares). Véase, por ejemplo, O'Connell *et al.* (2002) *"Phage Versus Phagemid Libraries For Generation Of Monoclonal Human Antibodies,"* J. Mol. Biol. 321:49-56; Hoogenboom *et al.* (2000) *"Natural And Designer Binding Sites Made By Phage Display Technology,"* Imm. Today 21:371078; Krebs *et al.* (2001) *"High-Throughput Generation And Engineering Of Recombinant Human Antibodies,"* J. Imm. Methods 254:67-84; y otras referencias citadas en este documento. Los anticuerpos monoclonales de una especie no humana pueden quimerizarse o humanizarse con el uso de humanización de anticurepos conocidas en la materia.

[00235] En forma alternativa, los anticuerpos totalmente humanos contra CD16A pueden producirse con el uso de animales transgénicos que tienen elementos de un sistema inmunológico humano (véase, por ej., U.S. Pat. Nos. 5,569,825 y 5,545,806), con el uso de células de sangre periférica humana (Casali *et al.* (1986) *"Human Monoclonals From Antigen-Specific Selection Of B Lymphocytes And Transformation By EBV,"* Science 234:476-479), por selección de una biblioteca de ADN de las células B humanas de acuerdo con el protocolo general definido por Huse *et al.* (1989) *"Generation Of A Large Combinatorial Library Of The Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda,"* Science 246:1275-1281, y por otros métodos.

[00236] En una realización preferida, el donante de unión es del anticuerpo 3G8 o una versión humanizada de los anteriores, por ej., tales como aquellas divulgadas en la publicación de solicitud de patente de EE UU 2004/0010124, que se incorpora a modo de referencia en este documento en su totalidad. Se contempla que, para algunos fines, puede ser ventajoso usar proteínas de unión a CD16A que se unen al receptor de CD16A en el mismo epítope unido por 3G8, o por lo menos lo suficientemente cerca para que este epítope bloquee la unión por 3G8. Los métodos para mapeo de epítopes y experimentos de unión competitiva para identificar proteínas de unión con las propiedades de unión deseadas como resulta conocido para aquellas personas expertas en la materia de inmunología experimental. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, citada con anterioridad; Stähli *et al.* (1983) *"Distinction Of Epítopes By Monoclonal Antibodies,"* Methods in Enzymology 92:242-253; Kirkland *et al.*

(1986) *"Analysis Of The Fine Specificity And Cross-Reactivity Of Monoclonal Anti-Lipid A Anticuerpos,"* J. Immunol. 137:3614-3619; Morel *et al.* (1988) *"Monoclonal Antibodies To Bovine Serum Albumin: Affinity And Specificity Determinations,"* Molec. Immunol. 25:7-15; Cheung *et al.* (1990) *"Epitope-Specific Antibody Response To The Surface Antigen Of Duck Hepatits B Virus In Infected Ducks,"* Virology 176:546-552; y Moldenhauer *et al.* (1990) *"Identity Of HML-1 Antigen On Intestinal Intraepithelial T Cells And Of B-ly7 Antigen On Hairy Cell Leukaemia,"* Scand. J. Immunol. 32:77-82. Por ejemplo, es posible determinar si dos anticuerpos se unen al mismo sitio por medio del uso de uno de los anticuerpos para capturar el antígeno en una placa de ELISA y luego midiendo la capacidad del segundo anticuerpo de unirse al antígeno capturado. La comparación de epítopes también puede lograrse rotulando un primer anticuerpo, directa o indirectamente, con una enzima, radionuclida o fluoroforo, y midiendo la capacidad de un segundo anticuerpo no marcado para inhibir la unión del primer anticuerpo al antígeno en las células, en solución, o en una fase sólida.

[00237] También es posible medir la habilidad de los anticuerpos de bloquear la unión del receptor de CD16A a compuestos inmunes formados sobre placas de ELISA. Dichos complejos inmunes se forman primero recubriendo la placa con un antígeno tales como fluoresceína, luego aplicando un anticuerpo anti-fluoresceína específico a la placa. Este complejo inmune luego sirve como el ligando para los receptores solubles de Fc tales como sFcRIIIa. En forma alternativa un complejo inmune soluble puede formarse y rotularse, directa o indirectamente, con una radionuclida o fluoróforo enzimático. La habilidad de los anticuerpos de inhibir la unión de estos complejos inmunes rotulados a los receptores de Fc en las células, en solución o en una fase sólida pueden entonces medirse.

[00238] Las proteínas de unión a CD16A de la invención pueden o no comprender una región Fc de inmunoglobulina humana. Las regiones de Fc no están presentes, por ejemplo, en proteínas de unión a scFv. Las regiones de Fc están presentes, por ejemplo, en anticuerpos IgG monoclonales tetraméricos humanos o humanizados. Como se describió con anterioridad, en algunas realizaciones de la presente invención, la proteína que se une a CD16A incluye una región de Fc que tiene una alteración de la función efectora, por ej., la afinidad reducida por un ligando efector tales como un receptor de Fc o componente C1 de complemento cuando se compara con la región Fc no alterada (*por ej.*, Fc de IgG1 natural, proteínas). En una realización la región Fc no se glicosila en el aminoácido de la región Fc correspondiente a la posición 297. Dichos anticuerpos carecen de función efectora de Fc.

[00239] De este modo, la proteína que se une a CD16A puede no inhibir la unión mediada por Fc a un ligando efector tales como un receptor de Fc o el componente C1 de complemento debido a la ausencia del término dominio Fc en la proteína de unión mientras que, en otros casos, la falta de unión o función efectora se debe a una alteración en la región constante del anticuerpo.

5.1.2.1 Las proteínas de unión a CD16A Que comprenden secuencias de CDR similares a las secuencias de CDR mAb 3G8.

[00240] Las proteínas de unión a CD16A que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen proteínas que comprende un derivado de la secuencia de CDR (*es decir*, que tiene una secuencia igual o similar) los CDRs del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. Los cADNs complementarios las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana del anticuerpo moclonal de ratón 3G8, que incluyen las secuencias de codificación de CDR, se clonaron y se secuenciaron como se describió. Las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de 3G8 se proveen a continuación. Con el uso de la región variable de ratón y secuencias de CDR, un gran número de anticuerpos humanizados monoclonales y quiméricos, que comprende regiones determinantes de complementariedad derivadas de CDRs 3G8 se produjeron y se analizaron sus propiedades. Para identificar los anticuerpos humanizados que se unen a CD16A con alta afinidad y tienen otras propiedades deseables, anticuerpo cadena pesadas que comprende una región VH con CDRs derivado de 3G8 se produjeron y se combinaron (por co-expresión) con cadenas livianas de anticuerpos que comprende una región VL con CDRs derivado de 3G8 para producir un anticuerpo tetramérico para análisis. Las propiedades de los anticuerpos tetraméricos resultantes se determinaron como se describe a continuación. Como se describe a continuación, las proteínas de unión a CD16A que comprenden 3G8 CDRs, tales como las proteínas de anticuerpos humanizados descritas en este documento, pueden usarse de acuerdo con la invención.

5.1.2.1.1 Región VH

[00241] En un aspecto, la proteína que se une a CD16A de la invención puede comprender un dominio variable de cadena pesada en la cual por lo menos un CDR (y usualmente tres CDRS) tienen la secuencia de un CDR (y más normalmente los tres CDRS) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para los cuales las porciones restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de y en forma sustancial similares a, la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

[00242] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo 3G8 humanizado o fragmento de anticuerpos que contienen CDRs derivados del anticuerpo 3G8 en un marco sustancialmente humano, pero por el cual por lo menos uno de los CDRs del dominio variable de cadena pesada difiere en secuencia del correspondiente CDR de cadena pesada del anticuerpo 3G8 de ratón. Por ejemplo, en una realización, el CDR(S) difiere de la secuencia de CDR 3G8 por lo menos por tener una o más sustituciones de CDR que se muestran conocidos en la materia por afectar la unión de 3G8 a CD16A, como se conoce en la materia o como se divulga en las Tablas 3 y 4A-H. Las proteínas de unión a CD16 apropiadas pueden comprender 0, 1, 2, 3, o 4, o o más de estas sustituciones (y con frecuencia tienen desde 1 hasta 4 de estas sustituciones) y en forma opcional pueden tener sustituciones adicionales también.

Tabla 3. Sustituciones de dominio V_H

Nro.	Posición en Kabat	Región	Sustituciones
1	2	FR1	Ile
2	5	FR1	Lys
3	10	FR1	Thr
4	30	FR1	Arg
5	34	CDR1	Val
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe o Tyr o Asp
8	54	CDR2	Asn
9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln o Lys o Ala o His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

Tabla 4A. Secuencias de V_H Derivadas de 3G8 V_H [*]

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VH	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VH	A	A	A	A	A	A	B
HxC	B	A	B	A	A	A	B
CxH	A	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VH-1	B	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-2	C	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-3	D	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-4	B	A	B	A	C	B	B
Hu3G8VH-5	B	A	B	A	C	A	B
Hu3G8VH-6	B	B	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-7	B	B	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-8	B	A	B	A	B	C	B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VH-9	B	A	B	B	B	B	B
Hu3G8VH-10	B	A	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-11	B	A	B	B	B	A	B
Hu3G8VH-12	B	A	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-13	B	A	B	D	B	A	B
Hu3G8VH-14	B	A	B	E	B	A	B
Hu3G8VH-15	B	A	B	A	D	A	B
Hu3G8VH-16	B	A	B	A	E	A	B
Hu3G8VH-17	B	A	B	A	F	A	B
Hu3G8VH-18	B	A	B	A	G	A	B
Hu3G8VH-19	B	A	B	A	C	C	B
Hu3G8VH-20	B	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-21	B	A	B	A	D	B	B
Hu3G8VH-22	B	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-23	B	B	B	C	E	C	B
Hu3G8VH-24	B	B	B	C	F	C	B
Hu3G8VH-25	B	B	B	C	G	C	B
Hu3G8VH-26	B	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-27	B	B	B	C	E	D	B
Hu3G8VH-28	B	B	B	C	F	D	B
Hu3G8VH-29	B	B	B	C	G	D	B
Hu3G8VH-30	B	B	B	C	C	D	B
Hu3G8VH-31	E	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-32	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-33	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-34	E	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-35	E	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-36	E	B	B	H	C	D	B
Hu3G8VH-37	E	B	B	H	E	C	B
Hu3G8VH-38	E	B	B	F	B	A	B
Hu3G8VH-39	E	B	B	I	B	A	B
Hu3G8VH-40	E	B	B	G	B	A	B
Hu3G8VH-41	E	B	B	J	B	A	B
Hu3G8VH-42	E	B	B	C	H	A	B
Hu3G8VH-43	E	B	B	C	H	C	B
Hu3G8VH-44	E	B	B	C	I	D	B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VH-45	E	B	B	C	J	D	B

*Las letras en la Tabla 4A se refieren a secuencias en las Tablas 4 B-H.

TABLE 4B: FR1

A	B	C	D	E		RESIDUO
Q	Q	Q	Q	Q		1
V	V	V	V	I		2
T	T	T	T	T		3
L	L	L	L	L		4
K	R	K	R	K		5
E	E	E	E	E		6
S	S	S	S	S		7
G	G	G	G	G		8
P	P	P	P	P		9
G	A	A	A	T		10
I	L	L	L	L		11
L	V	V	V	V		12
Q	K	K	K	K		13
P	P	P	P	P		14
S	T	T	T	T		15
Q	Q	Q	Q	Q		16
T	T	T	T	T		17
L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21
C	C	C	C	C		22
S	T	T	T	T		23
F	F	F	F	F		24
S	S	S	S	S		25
G	G	G	G	G		26
F	F	F	F	F		27
S	S	S	S	S		28
L	L	L	L	L		29
R	S	S	R	S		30
103	**104**	**105**	**106**	**107**		**SEC ID NRO..**

SEC ID NRO..	Secuencia
103	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLR
104	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
105	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
106	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR
107	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLS

TABLA 4C: CDR1

A	B		RESIDUO
T	T		31
S	S		32
G	G		33
M	V		34
G	G		35
V	V		35A
G	G		35B
108	**109**		**SEC ID NRO..**

SEC ID NRO..	Secuencia
108	TSGMGVG
109	TSGVGVG

TABLA 4D: FR2

A	B		RESIDUO
W	W		36
I	I		37
R	R		38
Q	Q		39
P	P		40
S	P		41
G	G		42
K	K		43

A	B		RESIDUO
G	A		44
L	L		45
E	E		46
W	W		47
L	L		48
A	A		49
110	**111**		**SEC ID NRO..**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
110	WIRQPSGKGLEWLA
111	WIRQPPGKALEWLA

TABLA 4E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESIDUO
H	H	H	H	H	L	H	L	H	L	50
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	51
W	Y	W	Y	W	D	F	W	D	W	52
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	53
D	N	D	D	N	D	D	D	D	N	54
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	55
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	57
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	58
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	59
N	N	S	N	N	S	S	S	S	S	60
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	61
A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	62
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	63
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	64
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	65
112	**113**	**114**	**115**	**116**	**117**	**118**	**119**	**120**	**121**	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	Secuencia
112	HIWWDDDKRYNPALKS
113	HIYWNDDKRYNPALKS
114	HIWWDDDKRYSPSLKS
115	HIYWDDDKRYNPALKS
116	HIWWNDDKRYNPALKS
117	LIDWDDDKRYSPSLKS
118	HIFWDDDKRYSPSLKS
119	LIWWDDDKRYSPSLKS
120	HIDWDDDKRYSPSLKS
121	LIWWNDDKRYSPSLKS

TABLA 4F: FR3

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESIDUO
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	66
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	67
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	68
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	69
S	S	S	S	S	S	S	T	T	T	70
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	71
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	72
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	73
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	74
S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	75
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	76
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	77
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	78
F	V	V	V	V	V	V	V	V	V	79
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	80
K	T	T	T	T	T	T	T	T	T	81
I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82
A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	82A
S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	82B
V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82C

D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	83
T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	84
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	85
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	86
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	91
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	92
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	93
Q	R	Q	T	K	A	H	R	H	Q	94
122	**123**	**124**	**125**	**126**	**127**	**128**	**129**	**130**	**131**	82 SEC ID NRO..
132	**133**	**134**	**135**	**136**	**137**	**138**	**139**	**140**	**141**	82A SEC ID NRO..
142	**143**	**144**	**145**	**146**	**147**	**148**	**149**	**150**	**151**	82B SEC ID NRO..
152	**153**	**154**	**155**	**156**	**157**	**158**	**159**	**160**	**161**	82C SEC ID NRO..

SEC ID NRO..	**Secuencia**
122	RLTISKDTSSNQVFLKIDTADTATYYCAQ
123	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
124	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
125	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
126	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
127	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
128	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
129	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
130	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
131	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
132	RLTISKDTSSNQVFLKADTADTATYYCAQ
133	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
134	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ

SEC ID NRO..	Secuencia
135	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAT
136	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAK
137	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAA
138	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
139	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
140	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
141	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
142	RLTISKDTSSNQVFLKSDTADTATYYCAQ
143	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
144	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
145	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAT
146	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAK
147	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAA
148	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
149	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
150	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
151	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
152	RLTISKDTSSNQVFLKVDTADTATYYCAQ
153	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
154	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
155	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
156	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
157	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
158	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
159	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
160	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
161	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ

TABLA 4G: CDR3

A	B	C	D	RESIDUO
I	I	I	I	95
N	N	N	N	96
P	P	P	P	97
A	A	A	A	98

W	W	Y	Y	99
F	F	F	F	100
A	D	A	D	101
Y	Y	Y	Y	102
162	**163**	**164**	**165**	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
162	INPAWFAY
163	INPAWFDY
164	INPAYFAY
165	INPAYFDY

TABLA 4H: FR4

A	B		RESIDUO
W	W		103
G	G		104
Q	Q		105
G	G		106
T	T		107
L	L		108
V	V		109
T	T		110
V	V		111
S	S		112
A	S		113
166	**167**		**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
166	WGQGTLVTVSA
167	WGQGTLVTVSS

[00243] En una realización, una proteína que se une a CD16A puede comprender un dominio de secuencia variable de cadena pesada que es igual que o similar a, el dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1, cuya secuencia se proporciona en la **SEC ID NRO.: 68**. Por

ejemplo, la invención proporciona una secuencia que se une a CD16A que comprende un dominio variable con una secuencia que **(1)** difiere del dominio VH de Hu3G8VH-1 **(SEC ID NRO.: 68)** por cero, una o más de una de las sustituciones de CDR establecidas en la Tabla 1; **(2)** difiere del dominio VH de Hu3G8VH-1 por cero, una o más de una de las sustituciones de marco que se indican en la Tabla **1**; y **(3)** es por lo menos alrededor de 80% idéntica, con frecuencia por lo menos alrededor de 90%, y en ocasiones por lo menos alrededor de 95% idéntica, o even por lo menos alrededor de 98% idéntica la secuencia de Hu3G8VH-1 VH en las posiciones restantes.

[00244] Los dominios VH ejemplificativos de las proteínas de unión CD16 de la invención tienen la secuencia de 3G8VH, Hu3G8VH-5 y Hu3G8VH-22 **(SEC ID NRO.: 79, SEC ID NRO.: 69 y SEC ID NRO.: 70, respectivamente)**. Las secuencias ejemplificativas de nucleótidos que codifican las secuencias de 3G8VH y Hu3G8VH-5 **(SEC ID NRO.: 79 y SEC ID NRO.: 69, respectivamente)** se proveen por la **SEC ID NRO.: 80 y SEC ID NRO.: 81**, respectivamente.

[00245] El dominio VH puede tener una secuencia que difiere de la de Hu3G8VH-1 **(SEC ID NRO.: 68)** por lo menos por una, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro 4, por lo menos cinco, o por lo menos seis de las sustituciones que se muestran en la **Tabla 3**. Se considera que estas sustituciones producen una mayor capacidad por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una secuencia que se une a CD16A cuando se administra a humanos. En ciertas realizaciones, el grado de identidad de secuencia con el dominio VH Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes es por lo menos alrededor de 80%, por lo menos alrededor de 90%, por lo menos alrededor de 95% o por lo menos alrededor de 98%.

[00246] Para ilustración y no como limitación, las secuencias de una cantidad de dominios VH de proteínas que construyen CD16A se muestra en la **Tabla 4**. Las cadenas pesadas que comprenden estas secuencias fusionadas a una región constante Cγ humana se co-expresaron con la cadena liviana hu3G8VL-1 (descrita a continuación) para formar anticuerpos tetraméricos, y unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos cuando se compara con el dominio VH hu3G8VH-1. Las construcciones en la cual el dominio VH tiene una secuencia de hu3G8VH-1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44 y 45 muestra alta unión por afinidad, con dominios VH hu3G8VH-6 y -40 que muestran proteínas de unión a CD16A que se unen en forma intermedia que comprende los dominios VH de hu3G8VH-5 y Hu3G8VH-22 **(SEC ID NRO.: 69 y SEC ID NRO.: 70, respectivamente)** se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables.

5.1.2.2 Región VL

[00247] Se condujeron estudios similares para identificar secuencias de dominio variable de cadena liviana con propiedades de unión favorables. En un aspecto, la invención proporciona una secuencia que se une a CD16A que contiene un dominio variable de cadena liviana en la

cual por lo menos un CDR (y usualmente tres CDRs) tiene la secuencia de a CDR (y más normalmente los tres CDRs) del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 cadena liviana y para los cuales las porciones restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de y en forma sustancial similares a, la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

[00248] En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de un anticuerpo 3G8 humanizado que contiene CDRs derivados del anticuerpo 3G8 en un marco sustancialmente humano, pero por el cual por lo menos uno de los CDRs de la cadena liviana variable dominio difiere en secuencia de the mouse monoclonal anticuerpo 3G8 cadena liviana CDR. En una realización, el CDR(S) difiere de la secuencia 3G8 por lo menos por tener una o más sustituciones de aminoácidos en un CDR, tales como, una o más sustituciones que se muestran en la Tabla 2 (por ej., arginina en la posición 24 en CDR1; serina en la posición 25 en CDR1; tirosina en la posición 32 en CDR1; leucina en la posición 33 en CDR1; ácido aspártico, triptofano o serina en la posición 50 en CDR2; serina en la posición 53 en CDR2; alanine o glutamine en la posición 55 en CDR2; treonina en la posición 56 en CDR2; serina en la posición 93 en CDR3; y/o treonina en la posición 94 en CDR3). En varias realizaciones, el dominio variable puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, o o más de estas sustituciones (y con frecuencia tienen desde 1 hasta 4 de estas sustituciones) y en forma opcional, puede tener sustituciones adicionales también.

[00249] En una realización, una proteína de unión CD16A apropiada puede comprender una secuencia de dominio variable de cadena liviana que es igual que o similar a, el dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 **(SEC ID NRO.: 71)**, cuya secuencia se proporciona en la **Tabla 6**. Por ejemplo, la invención proporciona una secuencia que se une a CD16A que comprende un dominio VL con una secuencia que **(1)** difiere del dominio VL de Hu3G8VL-1 **(SEC ID NRO.: 71)** por cero, uno, o más de las sustituciones de CDR establecidas en la **Tabla 5**; **(2)** difiere del dominio VL de Hu3G8VL-1 por cero, una o más de las sustituciones de marco que se establecen en la **Tabla 5**; y **(3)** es por lo menos alrededor de 80% idéntica, con frecuencia por lo menos alrededor de 90%, y en ocasiones por lo menos alrededor de 95% idéntica, o incluso por lo menos alrededor de 98% idéntica a la secuencia de VL Hu3G8VL **(SEC ID NRO.: 71)** en las posiciones restantes.

Tabla 5. Sustituciones de dominio V_L 3G8

Nro.	Posición Kabat	Región	Sustituciones
1	24	CDR1	Arg
2	25	CDR1	Ser
3	32	CDR1	Tyr
4	33	CDR1	Leu
5	50	CDR2	Asp o Trp o Ser

6	51	CDR2	Ala
7	53	CDR2	Ser
8	55	CDR2	Ala o Gln
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

Table 6. Secuencias V_L derivadas de 3G8 V_L*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Hu3G8VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-3	B	C	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-8	B	A	A	B	B	A	B
Hu3G8VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3G8VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3G8VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3G8VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3G8VL-14	B	A	A	A	B	B	B
Hu3G8VL-15	B	A	A	A	B	C	B
Hu3G8VL-16	B	A	A	A	B	D	B
Hu3G8VL-17	B	A	A	A	B	E	B
Hu3G8VL-18	B	B	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-19	B	B	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-22	B	C	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-23	B	C	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-25	B	D	A	D	B	D	B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3G8VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3G8VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3G8VL-35	B	B	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-39	B	C	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-44	B	A	A	K	B	A	B

*Las letras en la Tabla 6A se refieren a secuencias en las Tablas 6B-H.

TABLA 6B: FR1

A	B	RESIDUO
D	D	1
T	I	2
V	V	3
L	M	4
T	T	5
Q	Q	6
S	S	7
P	P	8
A	D	9
S	S	10
L	L	11
A	A	12
V	V	13

A	B	RESIDUO
S	S	14
L	L	15
G	G	16
Q	E	17
R	R	18
A	A	19
T	T	20
I	I	21
S	N	22
C	C	23
168	**169**	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
168	DTVLTQSPASLAVSL
169	DIVMTQSPDSLAVSL

TABLA 6C: CDR1

A	B	C	D	E	F	G	RESIDUO
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
170	**171**	**172**	**173**	**174**	**175**	**176**	**27 SEC ID**

							NRO.
177	**178**	**179**	**180**	**181**	**182**	**183**	**27A SEC ID NRO.**
184	**185**	**186**	**187**	**188**	**189**	**190**	**27B SEC ID NRO.**
191	**192**	**193**	**194**	**195**	**196**	**197**	**27C SEC ID NRO.**
198	**199**	**200**	**201**	**202**	**203**	**204**	**27D SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
170	KASQDGDSFMN
171	RASQDGDSFMN
172	KSSQDGDSFMN
173	KASQDGDSYMN
174	KASQDGDSFLN
175	KASQDGDSFMA
176	KASQDGDSYLA
177	KASSDGDSFMN
178	RASSDGDSFMN
179	KSSSDGDSFMN
180	KASSDGDSYMN
181	KASSDGDSFLN
182	KASSDGDSFMA
183	KASSDGDSYLA
184	KASVDGDSFMN
185	RASVDGDSFMN
186	KSSVDGDSFMN
187	KASVDGDSYMN
188	KASVDGDSFLN
189	KASVDGDSFMA
190	KASVDGDSYLA
191	KASDDGDSFMN
192	RASDDGDSFMN
193	KSSDDGDSFMN
194	KASDDGDSYMN
195	KASDDGDSFLN

SEC ID NRO..	Secuencia
196	KASDDGDSFMA
197	KASDDGDSYLA
198	KASFDGDSFMN
199	RASFDGDSFMN
200	KSSFDGDSFMN
201	KASFDGDSYMN
202	KASFDGDSFLN
203	KASFDGDSFMA
204	KASFDGDSYLA

TABLA 6D: FR2

A	RESIDUO
W	35
Y	36
Q	37
Q	38
K	39
P	40
G	41
Q	42
P	43
P	44
K	45
L	46
L	47
I	48
Y	49
205	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	Secuencia
205	WYQQKAPGQPPKLLIY

TABLA 6E: CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESIDUO
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
206	**207**	**208**	**209**	**210**	**211**	**212**	**213**	**214**	**215**	**216**	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
206	TTSNLES
207	DASNLES
208	WASNLES
209	TTSNLET
210	DASNLET
211	DASNLAT
212	SASNLQS
213	STSNLES
214	STSNLQS
215	TTSNLQS
216	TTSSLQS

TABLA 6F: FR3

A	B	RESIDUO
G	G	57
I	V	58
P	P	59
A	D	60
R	R	61
F	F	62
S	S	63
A	G	64

A	B	RESIDUO
S	S	65
G	G	66
S	S	67
G	G	68
T	T	69
D	D	70
F	F	71
T	T	72
L	L	73
N	T	74
I	I	75
H	S	76
P	S	77
V	L	78
E	Q	79
E	A	80
E	E	81
D	D	82
T	V	83
A	A	84
T	V	85
Y	Y	86
Y	Y	87
C	C	88
217	**218**	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
217	GIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC
218	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

TABLA 6G: CDR3

A	B	C	D	E	RESIDUO

Q	Q	Q	Q	Q	89
Q	Q	Q	Q	Q	90
S	S	S	S	S	91
N	Y	Y	N	N	92
E	S	E	S	E	93
D	T	D	D	T	94
P	P	P	P	P	95
Y	Y	Y	Y	Y	96
T	T	T	T	T	97
219	**220**	**221**	**222**	**223**	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	**Secuencia**
219	QQSNEDPYT
220	QQSYSTPYT
221	QQSYEDPYT
222	QQSNSDPYT
223	QQSNETPYT

TABLA 6H : FR4

A	B	RESIDUO
F	F	98
G	G	99
G	Q	100
G	G	101
T	T	102
K	K	103
L	L	104
E	E	105
I	I	106
K	K	107
224	**225**	**SEC ID NRO.**

SEC ID NRO..	Secuencia
224	FGGGTKLEIK
225	FGQGTKLEIK

[00250] Los dominios VL ejemplificativos de las proteínas de unión CD16 de la invención tienen la secuencia de 3G8VL, Hu3G8VL-1 o Hu3G8VL-43, **(SEC ID NRO.: 82, SEC ID NRO.: 71 y SEC ID NRO.: 72, respectivamente)** como se muestra en la Tabla**s 5 y 6**. Las secuencias ejemplificativas de nucleótidos que codifican 3G8VL **(SEC ID NRO.: 82)** y Hu3G8VL-1 **(SEC ID NRO.: 71)** se proporcionan en la **SEC ID NRO.: 83 y SEC ID NRO.: 84**, respectivamente.

[00251] El dominio VL puede tener una secuencia que difiere de la de Hu3G8VL- 1 (**SEC ID NRO.: 71**) por cero, una, por lo menos dos, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, o por lo menos 9 de las sustituciones que se muestran en la Tabla 2. Se considera que estas sustituciones producen una mayor capacidad por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una secuencia que se une a CD16A cuando se administra a humanos. En ciertas realizaciones, el grado de identidad de secuencia en las posiciones restantes es por lo menos alrededor de 80%, por lo menos alrededor de 90% por lo menos alrededor de 95% o por lo menos alrededor de 98%.

[00252] Para ilustración y no como limitación, las secuencias de una cantidad deproteínas de unión a CD16A VL dominios se muestra en la **Tabla 6**. Las cadenas livianas que comprenden estas secuencias fusionadas a un dominio Cκ. humano constante se co-expresaron con una cadena pesada Hu3G8VH (se describió con anterioridad) para formar anticuerpos tetraméricos, y la unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos cuando se compara con el dominio VL Hu3G8VL-1 **(SEC ID NRO.: 71)**. Las construcciones en la cual el dominio VL tiene una secuencia de hu3G8VL-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37, y 42 muestra alta unión por afinidad y hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 y 41 mostraron proteínas de unión que se unen en forma intermedia a CD16A que comprenden los dominios VL de Hu3G8VL-1, hu3G8VL-22, y hu3G8VL-43 se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables **(SEC ID NRO.: 71, SEC ID NRO.: 73 y SEC ID NRO.: 72, respectivamente)**.

5.1.2.2.1 Combinaciones de Dominios VL y/o VH

[00253] Como se conoce en la materia y se describió en este documento en algún otro lugar, las cadenas livianas y pesadas de inmunoglobulina pueden expresarse en forma recombinante en condiciones en las cuales se asocian para producir un diacuerpo, o pueden así combinarse *in vitro*. Se apreciará en forma adicional que un dominio VL derivado de 3G8 descrito en este documento puede combinarse con dominios VH derivados de 3G8 descritos en este

documento para producir un diacuerpo que se une a CD16A, y se contemplan todas dichas combinaciones.

[00254] Para ilustración y no para limitación, algunos ejemplos de diacuerpos CD16A útiles son aquellos que comprenden por lo menos un dominio VH y por lo menos un dominio VL, donde el dominio VH es de hu3G8VH-1, hu3G8VH-22 o hu3G8VH-5 **(SEC ID NRO.: 68, SEC ID NRO.: 70 y SEC ID NRO.: 69, respectivamente)** y el dominio VL es de hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 **(SEC ID NRO.: 71, SEC ID NRO.: 73 y SEC ID NRO.: 41, respectivamente)**. En particular, los anticuerpos humanizados que comprenden hu3G8VH-22 **(SEC ID NRO.: 22)** cualquiera de, hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 **(SEC ID NRO.: 71, SEC ID NRO.: 70 y SEC ID NRO.: 72, respectivamente)**, o hu3G8VH-5 **(SEC ID NRO.: 69)** y hu3G8VL-1 **(SEC ID NRO.: 71)** tienen propiedades favorables.

[00255] Aquellas personas con experiencia en la materia las secuencias de los dominios VL y VH descritos aquí y pueden modificarse en forma adicional por métodos conocidos en el arte tales como maduración por afinidad (Véase Schier *et al.* (1996) *"Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution of Complementarity Determinating Regions In The Center Del Antibody Binding Site,"* J. Mol. Biol. 263:551-567; Daugherty *et al.* (1998) *"Antibody Affinity Maduration Using Bacterial Surface Display,"* Protein Eng. 11:825-832; Boder *et al.* (1997) *"Yeast Surface Display For Screening Combinatorial Polypeptide Libraries,"* Nat. Biotechnol. 15:553-557; Boder *et al.* (2000) *"Directed Evolution Of Antibody Fragments With Monovalent Femtomolar Antigen-Binding Affinity,"* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97:10701-10705; Hudson *et al.* (2003) *"Engineered Antibodies,"* Nature Medicine 9:129-39). Por ejemplo, las proteínas de unión a CD16A pueden modificarse con el uso de técnicas de maduración por afinidad para identificar proteínas con una mayor capacidad por CD16A y/o menor afinidad por CD16B.

[00256] Una porteína de unión a CD16 ejemplificativa s el anticuerpo de ratón 3G8. La secuencia de aminoácidos que comprende los dominios VH y VL de 3G8 humanizados se describen en las **FIGS. 2, 9, 14** y que se establecen en la **SEC ID NRO.: 9, SEC ID NRO.: 11, SEC ID NRO.: 12, SEC ID NRO.: 14, SEC ID NRO.: 15, SEC ID NRO.: 16, SEC ID NRO.: 18, SEC ID NRO.: 19, SEC ID NRO.: 20, SEC ID NRO.: 21, SEC ID NRO.: 22, SEC ID NRO.: 68, SEC ID NRO.: 69, SEC ID NRO.: 70, SEC ID NRO.: 71 y SEC ID NRO.: 72**.

5.2 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN REGIONES Fc o PORCIONES DE LOS ANTERIORES

[00257] La invención abarca moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc o porciones de los anteriores (*por ej.*, a CH2 o dominio CH3). En ciertas realizaciones, el dominio de Fc, o porción(es) de los anteriores, comprende uno o más dominios constante(s) de la región Fc de IgG2, IgG3 o IgG4 (*por ej.*, CH2 o CH3). En otras realizaciones, la

invención abarca moléculas que comprenden un dominio Fc o porción de los anteriores, en donde dicho dominio de Fc o porción de los anteriores comprende por lo menos una modificación de aminoácido (*por ej.* sustitución) con relación a un dominio Fc tipo salvaje comparable o porción de los anteriores. Los dominios variantes Fc se conocen muy bien en la materia, y se usan principalmente para alterar el fenotipo del anticuerpo que comprende dicho dominio Fc variante como se evalúa en cualquiera de los ensayos de la actividad de unión o función efectora muy conocidos en la materia, *por ej.* ELISA, análisis SPR, o ADCC. Dichos dominios variantes Fc, o porciones de los anteriores, tienen uso en la presente invención al conferir o modificar la función efectora exhibida por una molécula del diacuerpo de la invención que comprende un dominio Fc (o porción de los anteriores) como se analiza en forma funcional, *por ej.*, en un ensayo dependiente de NK o macrófago. Los dominios variantes Fc identificados como aquellos que alteran la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE UU 2005/0037000 y 2005/0064514, Solicitudes Provisionales de los EE UU 60/626,510, presentada el 10 de noviembre de 2004, 60/636,663, presentada el 15 de diciembre de 2004, y 60/781,564, presentada el 10 de marzo de 2006, y Solicitudes de Patentes de EE UU 11/271, 140, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305,787, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los Inventores, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

[00258] En otras realizaciones, la invención abarca el uso de cualquier variante Fc conocida en la materia, tales como aquellos divulgados en Duncan *et al.* (1988) *"Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity receptor de Fc On IgG,"* Nature 332:563-564; Lund *et al.* (1991) *"Humun Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interactúan Con Distinct But Overlapping Sites On Human IgG,"* J. Immunol. 147:2657-2662; Lund *et al.* (1992) *"Multiple Binding Sites On CH2 Domain of IgG For Mouse Fc Gamma RII,"* Mol. Immunol. 29:53-59; Alegre *et al.* (1994) *"A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Anticuerpo Retains Immunosuppressive Properties In Vivo,"* Transplantation 57:1537-1543; Hutchins *et al.* (1995) *"Improved Biodistribution, Tumor Targeting, and Reduced Immunogenicity In Mice Con A Gamma 4 Variant Of Campath-1H,"* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92:11980-11984; Jefferis *et al.* (1995) *"Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation,"* Immunol. Lett. 44:111-117; Lund *et al.* (1995) *"Oligosaccharide-Proteína Interacciones In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors,"* FASEB J. 9:115-119; Jefferis *et al.* (1996) *"Modulation of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interacciones,"* Immunol. Lett. 54:101-104; Lund *et al.* (1996) *"Multiple Interactions of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Humun Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains,"* J. Immunol. 157:4963-4969; Armour *et al.* (1999) *"Recombinant Human IgG Moléculas Lacking*

Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-2624; Idusogie *et al.* (2000) *"Mapping Of The C1Q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG1 Fc,"* J. Immunol. 164:4178-4184; Reddy *et al.* (2000) *"Elimination Of receptor of Fc-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Anticuerpo To Human CD4,"* J. Immunol. 164:1925-1933; Xu *et al.* (2000) *"In Vitro Caracterización de Cinco Humanized OKT3 Effector Function Variant Antbodies,"* Cell. Immunol. 200:16-26; Idusogie *et al.* (2001) *"Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement,"* J. Immunol. 166:2571-2575; Shields *et al.* (2001) *"High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, y FcRn And Design De IgG1 Variants With Improved Binding to The Fc gamma R,"* J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Jefferis *et al.* (2002) *"Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR: Current Models,"* Immunol. Lett. 82:57-65; Presta *et al.* (2002) *"Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function,"* Biochem. Soc. Trans. 30:487-490); US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572; cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00259] En ciertas realizaciones, dicha una o más modificaciones a los aminoácidos de la región Fc reducen la afinidad y la avidez de la región Fc y, de este modo, la molécula de diacuerpo de la invención, para uno o más receptores de FcγR. En una realización específica, la invención abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o porción de los anteriores, en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácido con relación a una región de Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante sólo se une a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIIA. En otra realización específica, la invención abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o porción de los anteriores, en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácido con relación a una región de Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante sólo se une a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIA. En otra realización específica, la invención abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o porción de los anteriores, en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácido con relación a una región de Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante sólo se une a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIB. En ciertas realizaciones, la invención abarca moléculas que comprenden un dominio Fc variante en donde dicha variante confiere o media el aumento en la actividad de ADCC y/o un aumento en la unión a FcγRIIA (CD32A), con relación a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc tipo salvaje, según se mide con el uso de métodos conocidos por los expertos en el arte y descritos en este documento. En realizaciones alternativas, la invención abarca moléculas que comprenden un dominio Fc variante en donde dicha variante confiere o media una reducción en la actividad de ADCC (u otra función efectora) y/o un aumento en la unión a FcγRIIB (CD32B), con relación a una molécula que no

comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc tipo salvaje, según se mide con el uso de métodos conocidos por los expertos en el arte y descritos en este documento.

[00260] La invención abarca, además, el uso de un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos IgG. Como se conoce en la materia, la modificación de aminoácidos de la región Fc puede afectar profundamente la función efectora mediada por Fc y/o actividad de unión. Sin embargo, estas alteraciones en las características funcionales puede refinarse y/o manipularse en forma adicional cuando se implementa en el contexto de isotipos IgG seleccionados. En forma similar, las características originales del isotipo Fc pueden manipularse por la una o más modificaciones de aminoácidos. Los múltiples isotipos IgG (*es decir*, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4) exhiben diferentes propiedades físicas y funcionales que incluyen vida media sérica, fijación de complementos, afinidades de unión a FcγR y actividades de la función efectora (*por ej*. ADCC, CDC) debido a diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios de bisagra y/o Fc. En ciertas realizaciones, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG se seleccionan en forma independiente en base a sus respectivas actividades separadas de unión y/o función efectora con el fin de diseñar un diacuerpo con características deseadas. En la mayoría de las realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y regiones Fc/bisagra de IgG se han evaluado por separado para determinar la actividad de unión y/o función efectora como se describe en este documento o se conoce en la materia en un contexto de un IgG1. En ciertas realizaciones, dicha modificación de aminoácido y región de Fc/bisagra de IgG muestran funcionalidad similar, *por ej.*, una mayor capacidad por FcγRIIA, cuando cuando se evalúan por separado para determinar la unión o la función efectora de FcγR en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contiene (*por ej*. e inmunoglobulina). La combinación de dicha modificación de aminoácido y región Fc de IgG seleccionada actúan entonces en forma adicional o, con mayor preferencia, en forma sinérgica para modificar dicha funcionalidad en la molécula de diacuerpo de la invención, con relación a una molécula del diacuerpo de la invención que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones, dicha modificación de aminoácido y la región Fc de IgG muestran funcionalidades opuestas, *por ej*., aumento o reducción de, respectivamente, afinidad por FcγRIIA, cuando cuando se evalúan por separado para determinar la unión de FcγR y/o función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contiene Fc (*por ej.*, una inmunoglobulina) que comprende una región Fc de tipo salvaje como se describe en este documento o se conoce en la materia; la combinación de dicha modifricación “opuesta” de aminoácidos y región de IgG seleccionada que actúan para evitar o reducir en forma selectiva una funcionalidad específica en el diacuerpo de la invención con relación a un diacuerpo de la invención no comprende una región de Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo. En forma alternativa, la invención abarca regiones Fc variantes que comprenden combinaciones de las modificaciones de aminoácidos conocidas en la materia y región de IgG seleccionadas que

exhiben novedodas propiedades, cuyas propiedades no fueron detectables cuando dichas modificaciones y/o regiones se evaluaron en forma independiente como se describió con anterioridad.

[00261] Las características funcionales de los múltiples isotipos IgG, y dominios de los anteriores, se conocen muy bien en la materia. Las secuencias de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 se presentan en las **FIGS. 1A-1B**. La selección y/o combinaciones de dos o más dominios de isotipos específicos IgG para usar en los métodos de la invención puede basarse en cualquier parámetro conocido de los isotipos de origen que incluyen afinidad por FcγR (**Tabla 7**; Flesch *et al.* (2000) *"Functions Of Fc Receptors for Immunoglobulin G,"* J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) *"Identification Of A Segundoary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody,"* J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) *"Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040, cada uno de los cuales se incorpora por este medio a modo de referencia en su totalidad). Por ejemplo, uso de regiones o dominios de los isotipos IgG que existen limitada o ninguna unión a FcγRIIB, *por ej.*, IgG2 o IgG4, pueden encontrar uso particular donde un diacuerpo se desea diseñarse para maximizar la unión a un receptor de activación y minimizar la unión a un receptor inhibidor. En forma similar, el uso de regiones Fc o dominios de los isotipos IgG conocidos por unirse en forma preferencial a C1q o FcγRIIIA, *por ej.*, IgG3 (Brüggemann *et al.* (1987) *"Comparison Of The Effector Functions Of Human Inmunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies,"* J. Exp. Med. 166:1351-1361), pueden combinarse con Fc las modificaciones de aminoácidos de aquellos conocidos en la materia por potenciar ADCC, diseñar una molécula del diacuerpo de manera tal que la actividad de la función efectora, *por ej.*, activación de complementos o ADCC, se maximice.

Tabla 7. Características generales de unión de IgG a FcγR, adaptada de Flesch and Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156

Receptor	Afinidad estimada para IgG (M^{-1})	Afinidad relativa
FcγRI	10^8 - 10^9	IgG3>IgG1>>IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIIA $R^{131\ A}$	$<10^7$	IgG3>IgG1 sin unión: IgG2, IgG4
FcγRIIA $H^{131\ A}$	$<10^7$	IgG3>IgG1>IgG2 sin unión: IgG4
FcγRIIB ^{A}	$<10^7$	IgG3>IgG1>IgG4

		sin unión: IgG2
FcγRIII	$<10^7$	IgG3=IgG1 sin unión: IgG2,IgG4

[A] se une sólo a IgG en complejo

5.3 CONJUGADOS MOLECULARES

[00262] Las moléculas de diacuerpo de la invención pueden fusionarse en forma recombinante o conjugarse en forma química (que incluyen ambas conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos heterólogos (*es decir*, un polipéptido no relacionado; o porción de los anteriores, con preferencia por lo menos 10, por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90 o por lo menos 100 aminoácidos del polipéptido para generar propiedades de fusión. La fusión no necesariamente necesita ser directa, sino ocurrir a través de secuencias de ligadura.

[00263] Además, las moléculas de diacuerpo de la invención (*es decir*, polipéptidos) pueden conjugarse con un agente terapéutico o un resto farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. Como alternativa para orientar la conjugación, debido a los múltiples sitios que se unen al epítope en las moléculas de diacuerpo multivalentes, *por ej*., tetravalentes, de la invención, por lo menos una región de unión del diacuerpo puede diseñarse para unirse a agente terapéutico o resto farmacológico deseado sin afectar la unión del diacuerpo.

[00264] Los agentes terapéuticos o restos farmacológicos no se construyen como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, una toxina tales como abrina, ricina A, endotoxina pseudomonas (*es decir*, PE-40), o toxina de difteria, ricina, gelonina, y proteína antiviral pokeweed, una proteína tales como factor de necrosis tumoral, interferones que incluyen, aunque sin limitarse a, α-interferón (IFN-α), β-interferón (IFN-β), factor de crecimiento de nervio (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador de plasminógeno de tejidos (TPA), un agente apoptótico (*por ej*., TNF-α, TNF-β, AIM I como se divulga en la Publicación por PCT Nro. WO 97/33899), AIM II (*véase*, Publicación por PCT Nro. WO 97/34911), Fas ligy, y VEGI (Publicación por PCT Nro. WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico (*por ej.*, angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, una linfoquina (*por ej.*, interleucina-1 (“IL- 1”), interleucina-2 (“IL-2”), interleucina-6 (“IL-6”), factor estimulante de la colonia de macrófago de granulocitos (“GM-CSF”), y factor estimulante de la colonia de granulocitos (“G-CSF”), factor estimulante de la colonia de macrófagos, (“M-CSF”), o un factor de crecimiento (*por ej.*, hormona de crecimiento (“GH”); proteasas, o ribonucleasas.

[00265] Las moléculas de diacuerpo de la invención (*es decir*, polipéptidos) pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, el marcador secuencia de aminoácidos es un péptido de hexa-

histidina, tales como el tag provisto en un receptor de pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales se encuentran disponibles en el mercado. Como se describe en la Gentz *et al.* (1989*) "Bioassay For Trans-Activation Using Purified Human Immunodeficiency Virus TAT-Encoded Protein: Trans-Activation Require mRNA Synthesis,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, por ejemplo, hexa-histidine proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros rótulos de péptidos útiles para purificación incluyen, aunque no se limitan a, la marca de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítope derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.* (1984) *"The Structure of An Antigenic Determinant In A Protein,"* Cell, 37:767-778) y la marca de "bandera" (Knappik *et al.* (1994) *"An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification of Recombinant Antibody Fragments,"* Biotechniques, 17(4):754-761).

[00266] Pueden generarse proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de reacomodamiento génico, reacomodamiento de motivo, reacomodamiento de exones, y/o reacomodamiento de codones (denominado en forma colectiva como "reacomodamiento de ADN"). El reacomodamiento de ADN puede emplearse para alterar las actividades de las moléculas de la invención (*por ej*., sitios que se unen al epítope con afinidades superiores y menores tasas de disociación). Véase, en general, Patentes de EE UU Nros. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; y 5,837,458, y Patten *et al.* (1997) *"Applications Of DNA Shuffling To Pharmaceuticals And Vaccines,"* Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-733; Harayama (1998) *"Artificial Evolution By DNA Shuffling,"* Trends Biotechnol. 16:76-82; Hansson *et al.* (1999) *"Evolution Of Differential Substrate Specificities In Mu Class Glutathione Transferases Probed By DNA Shuffling,"* J. Mol. Biol. 287:265-276; y Lorenzo *et al.* (1998) *"PCR-Based Method Fort he Introduction of Mutations In Genes Cloned And Expressed In Vaccinia Virus,"* BioTechniques 24:308-313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan por este medio a modo de referencia en su totalidad). Las moléculas de diacuerpo de la invención, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención, pueden alterarse en forma adicional al someterse a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recobminación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención, puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, *etc.* de una o más moléculas heterólogas.

[00267] La presente invención abarca, además, las moléculas de diacuerpo de la invención conjugado con o reconociendo específicamente un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la cual la vida media sérica desea aumentarse y/o reducirse hasta un subgrupo particular de células. Las moléculas de la invención pueden usarse como diagnóstico para, por ejemplo, monitorear el desarrollo o la progresión de una enfermedad, un trastorno o una infección como parte de un procedimiento de análisis clínico para, *por ej*.,

determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por acople de las moléculas de la invención a una sustancia detectable o por las moléculas que reconocen en forma inmunoespecífica la sustancia detectable. Algunos ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones, y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse a o conjugarse ya sea directamente a las moléculas de la invención o indirectamente, a través de un intermediario (tales como, por ejemplo, una ligadura conocida en la materia) con el uso de técnicas conocidas en la materia, o la molécula puede reconocer en forma inmunoespecífica la sustancia detectable: uniendo en forma inmunoespecífica dicha sustancia. Véase, por ejemplo, Patente de los EE UU Nro. 4,741,900 para iones de metales que pueden conjugarse con anticuerpos para usar como diagnósticos de acuerdo con la presente invención. Dicho diagnóstico y detección puede lograrse designando las moléculas para reconocer en forma inmunoespecífica la sustancia detectable o por acoplamiento de las moléculas de la invención a sustancias detectables que incluyen, aunque sin limitarse a, varias enzimas, enzimas que incluyen, aunque sin limitarse a, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; complejos del grupo prostético tales como, aunque sin limitarse a, estreptavidina / biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, aunque sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tales como, aunque sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, aunque sin limitarse a, luciferasa, luciferina, y aequorina; material radiactivo tales como, aunque sin limitarse a, bismuto (^{213}Bi)**,** carbono (^{14}C), cromio (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), fluoro (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd, ^{159}Gd), galio (^{68}Ga, ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In), yodo (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), lantanio (^{140}La), lutetio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re, ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutemio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnetio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), tin (^{113}Sn, ^{117}Sn), tritio (^{3}H), xenon (^{133}Xe), yterbio (^{169}Yb, ^{175}Yb), ytrio (^{90}Y), zinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones con el uso de varias tomografías emisoras de positrones, y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

[00268] Las moléculas de diacuerpo de la invención pueden reconocer en forma inmunoespecífica o conjugarse con un resto terapéutico tales como una citotoxina (*por ej*., un agente citostático o citocidal), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (*por ej*., alfa emisores, gamma-emisores, *etc*.). Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células. Algunos ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona,

mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los anteriores. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, antimetabolitos (*por ej.*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de alquilación (*por ej.*, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y Lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisdiclorodiamina de paladio (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (*por ej.*, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*por ej.*, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC), y agentes anti-mitóticos (*por ej.*, vincristina y vinblastina).

[00269] Más aún, una molécula del diacuerpo de la invención puede conjugarse con o diseñarse para immunoespecíficamente reconocer restos terapéuticos tales como a materiales radiactivos o queladores macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (Véase con anterioridad para obtener ejemplos de materiales radiactivos). En ciertas realizaciones, el quelador macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al polipéptido por medio de una molécula de ligadura. Dichas moléculas de ligadura se conocen comúnmente en la materia y se describen en Denardo *et al.* (1998) *"Comparison Of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-Tetraacetic Acid (DOTA)-Peptide-ChL6, A Novel Immunoconjugate With Catabolizable Linker, To 2-Iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl]-DOTA-ChL6 In Breast Cancer Xenografts,"* Clin. Cáncer Res. 4:2483-2490; Peterson *et al.* (1999) *"Enzymatic Cleavage Of Peptide-Linked Radiolabels From Immunoconjugates,"* Bioconjug. Chem. 10:553-; y Zimmerman *et al,* (1999) *"A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake And Biodistributions Of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma mAb chCE7 F(ab')2 Fragments,"* Nucl. Med. Biol. 26:943-950 cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en sus totalidades.

[00270] Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a polipéptidos, que incluyen *por ej.*, dominios Fc, se conocen muy bien; véase, *por ej.*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cáncer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cáncer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al.* (1982) *"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Anticuerpo-Toxin Conjugates,"* Immunol. Rev., 62:119-158.

[00271] La molécula de diacuerpo de la invención puede administrarse con o sin un conjugado resto terapéutico con éste, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxicos y/o citoquina(s) para usar como un tratamiento terapéutico. Donde se administra solo, por lo menos un epítope de una molécula multivalente, *por ej*., tetravalente, molécula del diacuerpo puede diseñarse para reconocer en forma inmunoespecífica un agente terapéutico, *por ej*., factor(es) citotóxicos y/o citoquina(s), que puede administrarse en forma concurrente o consecutiva a la molécula de la invención. De este modo, la molécula de diacuerpo puede orientar específicamente el agente terapéutico de un modo similar para orientar la conjugación. En forma alternativa, una molécula de la invención puede conjugarse con un anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo tal como lo describe Segal en la Patente de los EE UU Nro. 4,676,980, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. Las moléculas de diacuerpo de la invención también pueden adjuntarse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno de destino. Dichos soportes sólidos incluyen, aunque no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

[00272] CARACTERIZACIÓN DE UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO

[00273] Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden caracterizarse en una variedad de modos. En particular, las moléculas de la invención pueden evaluarse para determinar la capacidad de unirse inmunológicamente en forma específica a un antígeno, *por ej*., FcRIIIA o FcRIIB, o, donde la molécula comprende un dominio Fc (o porción de los anteriores) para determinar la habilidad de exhibir interacción de Fc-FcγRs, *es decir* la unión específica de un dominio Fc (o porción de los anteriores) a un FcγR. Dicho ensayo puede realizarse en solución (*por ej*., Houghten (1992) *"The Use Of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries For The Identification Of Bioactive Peptides,"* BioTechniques, 13:412-421), on beads (Lam (1991) *"A New Type Of Synthetic Peptide Library For Identifying Ligand-Binding Activity,"* Nature, 354:82-84, sobre chips (Fodor (1993) *"Multiplexed Biochemical Assays With Biological Chips,"* Nature, 364:555-556), sobre bacterias (Patente de los EE UU Nro. 5,223,409), sobre esporas (Patentes de EE UU Nros. 5,571,698; 5,403,484; y 5,223,409), sobre plásmidos (Cull *et al.* (1992) *"Screening For Receptor Ligands Using Large Peptide Libraries Linked To The C Terminus Of The Lac Repressor,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869) o sobre fago (Scott *et al.* (1990) *"Searching For Peptide Ligands With An Epítope Library,"* Science, 249:386-390; Devlin (1990) *"Random Peptide Libraries: A Source Of Specific Protein Binding Moléculas,"* Science, 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *"Peptides On Phage: A Vast Library Of Peptides For Identifying Ligands,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382; y Felici (1991) *"Selection Of Antibody Ligands From A Large Library Of Oligopeptides Expressed On A Multivalent Exposition Vector,"* J. Mol. Biol., 222:301-310) (cada una de estas referencias se incorpora a modo de referencia en este documento en su totalidad). Las moléculas que se han

identificado para unirse inmunológicamente en forma específica a un antígeno, *por ej*., FcγRIIIA, pueden entonces evaluarse para determinar su especificidad y afinidad por el antígeno.

[00274] Las moléculas de la invención que se han diseñado para comprender múltiples dominios de unión al epítope pueden evaluarse para determinar la unón inmunoespecífica a uno o más antígenos (*por ej*., antígeno contra el cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos (*por ej*., FcγR)) o, donde las moléculas comprenden un dominio Fc (o porción de los anteriores) para interacción Fc-FcγR por cualquier método conocido en la materia. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunoespecífica, reactividad cruzada, e interacciones Fc-FcγR incluyen, aunque no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos con el uso de técnicas tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), "sándwich" inmunoensayos, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reaccioens de difusión de gel de precipitina, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complementos, ensayos inmuno-radiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, sólo para nombrar algunos. Dichos ensayos son de rutina y muy conocidos en la materia (*véase, por ej*., Ausubel *et al*., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que se incorpora a modo de referencia en este documento en su totalidad).

[00275] La afinidad de unión y la desviación de interacción de antígeno-dominio de unión o interacción Fc-FcγR pueden determinarse por ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno rotulado, tales como FcγR tetramérico (*por ej*., ^{3}H o ^{125}I, remitirse a la sección 5.4.1) con una molécula de interés (*por ej*., las moléculas de la presente invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítope en la presencia de cantidades crecientes de epítope no marcado, tales como FcγR tetramérico (remitirse a la sección 5.4.1), y la detección de la molécula unida al antígeno marcado. La afinidad de la molécula de la presente invención para un antígenoy calificaciones de unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación por análisis de Scatchard.

[00276] Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención para un antígeno FcγR pueden determinarse inicialmente con el uso de ensayos *in vitro* (ensayos con base bioquímica o inmunológica) conocidos en la materia para interacciones de antígeno-dominio de unión o Fc-FcγR, que incluyen aunque sin limitarse a ensayo ELISA, ensayo por resonancia plasmónica de superficie, ensayos de inmunoprecipitación. Con preferencia, las propiedades de unión de las moléculas de la invención también se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de la célula efectora del mediador de FcγR, como se describe en la Sección 5.4.2. En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades similares de unión en modelos *in vivo* (tales como aquellas

que se describen y se divulgan en este documento) como aquellos en los ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos basados *in vitro* pero no exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

[00277] En algunas realizaciones, la selección e identificación de las moléculas que comprenden múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, dominios Fc (or porciones de los anteriores) se realizan con ensayos de base funcional, con preferencia en un modo de alto rendimiento. Los ensayos de base funcional pueden ser cualquier ensayo conocido en la materia para caracterizar una o más funciones de las células efectoras mediadas por FcγR tales como las que se describen en este documento en las Secciones 5.4.2 y 5.4.3. Algunos ejemplos no limitativos de funciones de la célula efectora que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención, incluyen aunque no se limitan a, la citotoxicidad mediada por células que dependen de los anticuerpos (ADCC), Fagocitosis que depende de los anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q, y la citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

[00278] En una realización preferida, el análisis cinético BIAcore se usa para determinar la unión de los índices en o fuera de las moléculas de la presente invención a un antígeno o FcγR. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un antígeno o FcγR de chips con moléculas inmovilizadas (*por ej.*, moléculas que comprenden dominios de unión al epítope o dominios Fc (o porciones de los anteriores), respectivamente) sobre su superficie. El análisis BIACORE se describe en la Sección 5.4.3**.**

[00279] Con preferencia, la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), con el uso de cualquiera de las técnicas conocidas por aquellas personas expertas en la materia, se usa para ensayo de base funcional o inmunológica para caracterizar moléculas de la invención. Los clasificadores de flujo son capaces de examinar rápidamente un gran número de células individuales que se han unido, *por ej.*, posonizado, por moléculas de la invención (*por ej.*, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro *et al.* (1995) Practical Flow Cytometry). En forma adicional, los parámetros específicos usados para optimización del comportamiento del diacuerpo, incluyen aunque no se limitan a, concentración de antígenos (*es decir*, complejo tetramérico FcγR, remitirse a la sección 5.4.1), tiempo de competición cinética, o rigurosidad de FACS, cada una de las cuales puede variarse con el fin de seleccionar las moléculas de diacuerpo que comprenden moléculas de la invención que exhiben propiedades de unión específicas, *por ej.*, concurrent unión a multiple epítopes. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas se conocen muy bien en la materia. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE UU Nros. 4,347,935; 5,464,581; 5,483,469; 5,602,039; 5,643,796; y 6,211,477; cuyos contenidos completos se incorporan a modo de referencia en este documento. Otros

citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ fabricado por Becton Dickinson and Company, y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica.

[00280] La caracterización de la afinidad de unión al antígeno de destino o afinidad de unión a Fc-FcγR, y evaluación del antígeno de destino o densidad de FcγR sobre una superficie celular puede realizarse por métodos muy conocidos en la materia tales como análisis de Scatchard o por medio del uso de kits según las instrucciones del fabricante, tales como Quantum™ Simply Cellular ® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). El o los ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la materia para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por FcγR según lo conocido por los expertos en el arte o como se describe en este documento. En realizaciones específicas, las moléculas de la invención que comprende múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, y dominio Fc (o porción de los anteriores) se evalúan en an ensayo ELISA para determinar la unión a uno o más antígenos de destino o uno o más FcγRs, *por ej.*, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIA; seguido de uno o más ensayos ADCC realizados. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se evalúan en forma adicional con el uso de un ensayo basado en resonancia plasmónica de superficie, *por ej*., BIAcore. Los ensayos basados en resonancia plasmónica de superficie se conocen muy bien en la materia, y se discuten en forma adicional en la Sección 5.4.3, y ejemplificado en este documento, *por ej*., en el **Ejemplo 6.1**.

[00281] En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención que comprende múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, y dominio Fc (o porción de los anteriores) se caracteriza en forma adicional en un modelo animal para determinar la interacción con un antígeno de destino (*por ej.*, un FcγR) o para interacción Fc-FcγR. Donde deseen evaluarse las interacciones Fc-FcγR, los modelos animales preferidos para usar en los métodos de la invención are, por ejemplo, los FcγR humanos que expresan ratones transgénicos, *por ej.*, cualquier modelo animal descrito en la Patente de los EE UU Nro. 5,877,397, y 6,676,927 las cuales se incorporan en este documento a modo de referencia en su totalidad. Ratones transgénicos adicionales para usar en dichos métodos incluyen, aunque no se limitan a, ratones con knockout de FcγRIIA lampiños que llevan FcγRIIIA humano; ratones con knockout de FcγRIIA lampiños que llevan FcγRIIA humano; ratones con knockout de FcγRIIA lampiños que llevan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones con knockout de FcγRIIA lampiños que llevan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano**;** ratones lampiños con knockout de FcγRIIIA y FcγRIIA que llevan FcγRIIIA humano y FcγRIIA y ratones lampiños con knockout de FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB que llevan FcγRIIIA humano, FcγRIIA and FcγRIIB**.**

5.3.1 ENSAYOS DE UNIÓN QUE COMPRENDEN FcγR

[00282] La caracterización de unión a FcγR por moléculas que comprenden un dominio Fc (o porción de los anteriores) y/o que comprende epítope dominio de unión específica para un FcγR puede realizarse con el uso de cualquier FcγR, que incluyen aunque sin limitarse a

variantes polimórficas de FcγR. En algunas realizaciones, una variante polimórfica de FcγRIIIA se usa, que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras realizaciones, la caracterización se realiza con el uso de una variante polimórfica de FcγRIIIA que contiene una valina en la posición 158. FcγRIIIA 158V muestra una mayor afinidad para IgG1 que 158F y un aumento en la actividad de ADCC (véase, *por ej.*, Koene *et al.* (1997) *"Fc gammaRIIIa-158V/F Polymorphism Influences the Binding of IgG By Natural Killer Cell Fc gammaRIIIa, Independently Of The Fc gammaRIIIa-48L/R/H Phenotype,"* Blood, 90:1109-14; Wu *et al.* (1997) *"A Novel Polymorphism Of FcgammaRIIIa (CD16) Alters Receptor Function And Predisposes To Autoimmune Disease,"* J. Clin. Invest. 100: 1059-70, ambas de las cuales se incorporan en este documento a modo de referencia en sus totalidades); este residuo interactúa de hecho directamente con la región inferior de bisagra de IgG1 como se mostró recientemente por estudios de co-cristalización de IgG1-FcγRIIIA, véase, *por ej.*, Sondermann *et al.* (2000) *"The 3,2-A Crystal Structure of Human IgG1 Fc Fragment-Fc gammaRIII complex,"* Nature, 406(6793):267-273, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. Los estudios han demostrado que en algunos casos, los anticuerpos terapéuticos tienen mejorada eficacia en pacientes homócigos de FcγRIIIA-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20 Rituximab fue terapéuticamente más efectivo en Pacientes homócigos FcγRIIIA158V cuando se compara con pacientes homócigos FcγRIIIA 158F (Véase, *por ej.*, Cartron *et al.* (2002) *"Therapeutic Activity Of The Humanized Monoclonal Antibody anti-CD20 And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcgammaRIIIA Gene,"* Blood, 99(3): 754-758). En otras realizaciones, las moléculas terapéuticas que comprenden esta región también pueden ser más efectivas en pacientes heterócigos para FcγRIIIA-158V y FcγRIIIA-158F, y en pacientes con FcγRIIA-131H. Aunque sin intención de ligarse a un mecanismo de acción particular, la selección de moléculas de la invención con alotipos alternativos pueden proporcionar variantes que una vez diseñados en diacuerpos terapéuticos serán clínicamente más eficaces para pacientes homócigos para dicho alotipo**.**

[00283] Un ensayo de unión a FcγR se desarrolló para determinar la unión de las moléculas de la invención to FcγR, y, en particular, para determinar unión de dominios Fc a FcγR. El ensayo permitió la detección y cuantificación de interacciones Fc-FcγR, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor para su ligando, *por ej.*, en el rango micromolar para FcγRIIB y FcγRIIIA. El método se describe en detalle en la Solicitud Internacional WO04/063351 y Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE UU 2005/0037000 y 2005/0064514, cada uno de los cuales se incorpora por este medio a modo de referencia en su totalidad. En forma sintética, el método incluye la formación de un complejo FcγR que puede usarse en cualquier inmunoensayo estándar conocido en la materia, *por ej.*, FACS, ELISA, resonancia plasmónica de superficie, etc. En forma adicional, el complejo FcγR tiene una avidez mejorada por una región de Fc, con relación a un FcγR sin complejo. De acuerdo con

la invención, el complejo molecular preferido es un complejo inmunológico tetramérico, que comprende: **(a)** la región soluble de FcγR (*por ej.*, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); **(b)** una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) ligada en forma operativa al extremo terminal C de la región soluble de FcγR (*por ej.*, la región soluble de FcγRIIIA, FcγRIIA o FcγRIIB); y **(c)** estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una proporción molar para formar un complejo de FcγR tetramérico (con preferencia en una proporción molar 5:1). La proteína de fusión se biotinila en forma enzimática, con el uso de por ejemplo, la enzima de *E.coli* Bir A, una ligasa de biotina que biotiniliza específicamente un residuo de lisina en la secuencia de 15 aminoácidos AVITAG. Las proteínas solubles biotiniladas FcγR luego se mezclan con SA-PE en una proporcón molar de FcγR soluble biotinilada 1X SA-PE:5X para formar un complejo FcγR tetramérico.

[00284] Se ha demostrado que los polipéptidos que comprenden regiones Fc have se unen a los complejos FcγR tetraméricos con por lo menos una afinidad 8 veces mayor que el FcγR monomérico no complejado. La unión de polipéptidos que comprende regiones Fc a los complejos FcγR tetraméricos puede determinarse con el uso de las técnicas estándar conocidas por aquellas personas con experiencia en la materia, tales como por ejemplo, la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos ELISA, *etc.*

[00285] La invención abarca el uso de los complejos inmunes que comprenden moléculas de la invención, y formados de acuerdo con los métodos descritos con anterioridad, para determinar la funcionalidad de las moléculas que comprenden una región de Fc ensayos basads en células o libres de células.

[00286] Por una cuestión de conveniencia, los reactivos pueden proporcionarse en un kit para ensayo, *es decir*, una combinación envasada de reactivos para analizar la capacidad de moléculas que comprenden regiones Fc de unirse a complejos FcγR tetraméricos. Otras formas de complejos moleculares para usar en la determinación de interacciones Fc-FcγR también se contemplan para usar en los métodos de la invención, *por ej.*, proteínas de fusión formadas como se describe en la Solicitud Provisional de EE UU 60/439,709, presentada el 13 de enero de 2003; que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

5.3.2 ENSAYOS FUNCIONALES DE MOLÉCULAS CON CADENAS PESADAS VARIANTES

[00287] La invención abarca caracterización de las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, dominios Fc (or porciones de los anteriores) con el uso de ensayos conocidos por aquellas personas expertas en la materia para identificar la función generadora de respuesta de la célula de las moléculas. En particular, la invención abarca caracterizar las moléculas de la invención para la función efectora de células mediada por FcγR. En forma adicional, donde por lo menos uno de los

antígenos de destino de la molécula de diacuerpo de la invención es un FcγR, la unión de FcγR por la molécula de diacuerpo puede servir para activar las vías mediadas por FcγR similares a las activadas por la unión a FcγR-Fc. De este modo, donde por lo menos un dominio de unión al epítope de la molécula de diacuerpo reconoce un FcγR, la molécula de diacuerpo puede generar función de células efectoras mediada por FcγR sin contiene contener un dominio Fc (o porción de los anteriores), o sin unión concomitante de Fc-FcγR. Algunos ejemplos de funciones de la célula efectora que pueden evaluarse de acuerdo con la invención, incluyen aunque no se limitan a, la citotoxicidad mediada por células que dependen de los anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q, y la citotoxicidad mediada por células que dependen del complemento. Cualquier ensayo basado en células o libre de células conocido por aquellas personas expertas en la materia para determinar la actividad de la función de la célula efectora puede usarse (para obtener ensayos de célula efectora, véase Perussia *et al.* (2000) *"Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells,"* Methods Mol. Biol. 121: 179-92; Baggiolini *et al.* (1988) *"Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity,"* Experientia, 44(10): 841-848; Lehmann *et al.* (2000) *"Phagocytosis: Measurement Por Flow Cytometry,"* J. Immunol. Métodos, 243(1-2): 229-42; Brown (1994) *"In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction,"* Métodos Cell Biol., 45: 147-64; Munn *et al.* (1990) *"Fagocitosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Estimulating Factor,"* J. Exp. Med., 172: 231-237, Abdul-Majid *et al.* (2002) *"Fc Receptors Are Critical For Autoimmune Inflammatory Damage To The Central Nervous System In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis,"* Scand. J. Immunol. 55: 70-81; Ding *et al.* (1998) *"Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids,"* Immunity 8:403-411, cada una de las cuales se incorpora a modo de referencia en este documento en su totalidad).

[00288] En una realización, las moléculas de la invención pueden evaluarse para fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. En forma alternativa, la fagocitosis mediada por FcγR **de las** moléculas de la invención puede evaluarse en otros fagocitos, *por ej*., neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse con el uso de procedimientos estándar conocidos por aquellas personas expertas en la materia (*por ej.*, see Brown (1994) *"In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction,"* Métodos Cell Biol., 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas de la invención se caracteriza por la medición de la capacidad de las células THP-1 de fagocitar glóbulos rojos de oveja opsonizados con IgG con fluoresceína (SRBC) por métodos descritos con anterioridad (Tridandapani *et al.* (2000) *"The Adapter*

Proteína LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells," J. Biol. Chem. 275: 20480-20487).

[00289] Otro ensayo ejemplificativo para determinar la fagocitosis de las moléculas de la invención es un ensayo de opsonofagocitosis que depende del anticuerpo (ADCP) que puede comprender los siguientes: recubrir una biopartícula de destino tales como FITC marcado con *Escherichia coli* (Molecular Probes) o FITC *Staphylococcus aureus* con (i) anticuerpo 4-4-20 tipo salvaje, un anticuerpo para fluoresceína (Véase Bedzyk *et al.* (1989) *"Comparison Of Variable Region Primary Structures Within de An Anti-Fluoresceína Idiotype Family,"* J. Biol. Chem, 264(3): 1565-1569, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad), como anticuerpo de control para ADCP dependiente de FcγR; o (ii) anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que knoquea la unión a FcγRIII, como un control anterior para ADCP dependiente de FcγR (iii) un diacuerpo que comprende el dominio de unión al epítope de 4-4-20 y un dominio Fc y/o un dominio de unión al epítope específico para FcγRIII; y formar la partícula opsonizada; agregar cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) para células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible de ATCC) a una proporción de 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1 o 100: 1 para permitir que ocurra la fagocitosis mediada por FcγR; con preferencia incubar las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37°C durante 1,5 hora; agregar azul de tripan después de la incubación (con preferencia a temperatura ambiente durante 2-3 min.) a las células para desactivar la fluorescencia de las bacterias que se adhieren a la parte exterior de la superficie celular sin internalizarse; transferir las células a un buffer de FACS (*por ej.*, 0,1%, BSA en PBS, 0,1%, azida de sodio), analizar la fluorescencia de las células THP 1 con el uso de FACS (*por ej.*, BD FACS Calibur). Con preferencia, las células THP-1 used in the assay se analizaron por FACS para determinar la expresión de FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan ambos CD32A y CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea al conducir el ensayo ACDP de acuerdo con los métodos de la invención. Las células THP-1 con preferencia se bloquean con 100 μg/mL de IgG1 soluble o 10% suero humano. Para analizar el grado de ADCP, la puerta se fija con preferencia en las células THP-1 y se mide la intensidad de fluorescencia media. La actividad de ADCP para mutantes individuales se calcula y se informa como un valor normalizado al chMab 4-4-20 obtenido tipo salvaje. Las partículas opsonizadas se agregan a las células THP-1 de manera tal que la proporción de las partículas opsonizadas a las células THP-1 es 30:1 o 60:1. En las realizaciones más preferidas, el ensayo ACDP se conduce con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y las células THP-1 (para servir como actividad de ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FITC, las células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 tipo salvaje (para servir como actividad de ADCP dependiente de FcγR), *E coli*-FITC, las células THP-1, 4-4-20 D265A (para servir como el control anterior para la actividad de ADCP dependiente de FcγR).

[00290] En otra realización, las moléculas de la invención pueden evaluarse para determinar la actividad de ADCC mediada por FcγR en células efectoras, *por ej.*, células asesinas naturales, con el uso de cualquiera de los métodos estándar conocidos por aquellas personas expertas en la materia (*Véase por ej.*, Perussia *et al.* (2000) *"Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC(Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells,"* Métodos Mol. Biol. 121: 179-92; Weng *et al.* (2003) *"Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma,"* J. Clin. Oncol. 21:3940-3947; Ding *et al.* (1998) *"Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids,"* Immunity 8:403-411). Un ensayo ejemplificativo para determinar la actividad de ADCC de las moléculas de la invención se basa en un ensayo de liberación de ^{51}Cr que comprende: marcar las células de destino con $[^{51}Cr]Na_2CrO_4$ (esta molécula de membrana celular permeable se usa comúnmente para marcar ya que se une a proteínas citoplasmáticas y aunque se libere espontáneamente de células con cinética lenta, se libera en forma masiva luego de la necrosis de células de destino); opsonizar las células de destino con las moléculas de la invención que comprende cadenas pesadas variantes; combinar las células de destino radiomarcadas opsonizadas con células efectoras en una placa de microtitulación en una proporción apropiada de células de destino a células efectoras; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37°C; recolectar los sobrenadantes; y analizar la radiactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la invención luego puede determinarse, por ejemplo con el uso de la siguiente fórmula: % lisis = (cpm experimental - cpm de fuga de destino)/(cpm de lisis de detergente - cpm de fuga de destino) x 100%. En forma alternativa, % lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima-liberación espontánea). La lisis específica puede calcularse con el uso de la fórmula: specific lisis = % lisis con las moléculas de la invención - % lisis en ausencia de las moléculas de la invención. Puede generarse un gráfico variando en forma indistinta la proporción de célula efectora: de destino o concentración de anticuerpo.

[00291] Con preferencia, la célula generadora de respuestas usada en los ensayos ADCC realizados de la invención son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que con preferencia se purifican de sangre humana normal, con el uso de métodos estándar conocidos por los expertos en el arte, *por ej.*, con el uso de centrifugado de gradiente por densidad de Ficoll-Paque. Las células efectoras preferidas para usar en los métodos de la invención expresan diferentes receptores de activación de FcγR. La invención abarca, células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos derivados de monocitos de sangre humana completa que expresan ambos FcγRIIIA y FcγRIIB, para determinar si los mutantes de anticuerpos de cadena pesada muestran el aumento en la actividad de ADCC y fagocitosis con relación a anticuerpos de IgG1 tipo salvaje.

[00292] La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis a través de la expresión del receptor FcγRI de alta afinidad y el receptor de baja afinidad FcγRIIA (Fleit *et al.* (1991) *"The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses Fc Gamma RI And Fc Gamma RII,"* J. Leuk. Biol. 49: 556-565). Las células THP-1 no expresan constitutivamente FcγRIIA o FcγRIIB. La estimulación de estas células con citoquinas afecta el patrón de expresión de FcR (Pricop *et al.* (2001) *"Differential Modulation of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 y Th2 Cytokines,"* J. of Immunol., 166: 531-537). El crecimiento de las células THP-1 en la presencia de la citoquina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y causa una reducción en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de también puede potenciarse al aumentar la densidad celular (Tridandapani *et al.* (2002) *"Regulated Expresión y Inhibitory Function Of Fcgamma RIIB In Human Monocytic Cells,"* J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089). En contraste, se ha reportado que IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIIA (Pearse *et al.* (1993) *"Interferon Gamma-Induced Transcription Of The High-Affinity receptor de Fc Para IgG Requiere Assembly Of A Complex That Includes The 91-kDa Subunit Of Transcription Factor ISGF3,"* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 4314-4318). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular pueden determinarse por FACS con el uso de métodos comunes conocidos por los expertos en el arte. La expresión inducida por citoquinas de FcγR en la superficie celular proporciona un sistema para analizar tanto la activación como la inhibición en la presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 son incapaces de expresar el FcγRIIB la invención abarca, además, otra línea celular de monocitos humanos, U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian en forma terminal en macrófagos en la presencia de IFNγ y TNF (Koren *et al.* (1979) *"In Vitro Activation of A Human Macrophage-Like Cell Line,"* Nature 279: 328-331).

[00293] La matanza de células tumorales que dependen de FcγR está mediada por macrófago y células NK en modelos de tumores de ratón (Clynes *et al.* (1998) *"Fc Receptors Are Required In Passive And Active Immunity To Melanoma,"* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 652-656). La invención abarca el uso de monocitos elutriados de donantes como células efectoras para analizar la eficiencia de mutantes de Fc para desencadenar la citotoxicidad celular de células de destino tanto en ensayos realizados de fagocitosis como ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIIA, y FcγRIIB se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de FcγR de monocitos elutriados, monocitos elutriados frescos, monocitos mantenidos en 10% FBS, y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y /o en suero humano puede determinarse con el uso de métodos comunes conocidos por aquellas personas expertas en la materia. Por ejemplo, las células pueden mancharse con anticuerpos específicos de y analizarse por FACS para determinar los perfiles de FcR. Las condiciones que simplemente imitan mejor el la expresión de FcγR de macrófago *in vivo* se usa luego para los métodos de la invención.

[00294] En algunas realizaciones, la invención abarca el uso de células de ratón en especial cuando las células humanas con los perfiles correctos de FcγR son incapaces de obtenerse. En algunas realizaciones, la invención abarca la línea celular de macrófago de ratón RAW264,7(ATCC) que puede transfectarse con human FcγRIIIA y transfectantes estables aislados con el uso de métodos conocidos en la materia, véase, *por ej.*, Ralph *et al.* (1977) *"Antibody-Dependent Killing Of Erythrocyte And Tumor Targets By Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement By PPD Y LPS,"* J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes pueden cuantificarse para determinar la expresión de FcγRIIIA por análisis FACS con el uso de experimentación de rutina y altos expresores puede usarse enh los ensayos ADCC realizados de la invención. En otras realizaciones, la invención abarca aislamiento de macrófago peritoneano de bazo que expresa FRcγR humano de ratones knock out transgénicos tales como aquellos divulgados en este documento.

[00295] Los linfocitos pueden cosecharse de sangre periférica de donantes (PBM) con el uso de un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población mononuclear aislada de células, la mayoría de la actividad de ADCC ocurre por medio de las células naturales asesinas (NK) que contienen FcγRIIIA aunque no FcγRIIB sobre su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de mutantes al desencadenar el ADCC de las células NK y establecer los reactivos para evaluar con monocitos elutriados.

[00296] Las células de destino usadas en los ensayos ADCC realizados de la invención incluyen, aunque no se limitan a, líneas celulares de cáncer de mama, *por ej.*, SK-BR-3 con número de acceso al ATCC HTB-30 (véase, *por ej.*, Tremp *et al.* (1976) *"Human Breast Cáncer In Culture,"* Recent Results Cáncer Res. 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitts, *por ej.*, células Raji con número de acceso al ATCC CCL-86 (véase, *por ej.*, Epstein *et al.* (1965) *"Characteristics And Mode Of Growth Of Tissue Culture Strain (EB1) Of Human Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma,"* J. Natl. Cáncer Inst. 34: 231-240), y células de Daudi con número de acceso al ATCC CCL-213 (véase, *por ej.*, Klein *et al.* (1968) *"Surface IgM-Kappa Specificity On A Burkitt Lymphoma Cell In Vivo And In Derived Culture Lines,"* Cáncer Res. 28: 1300-1310). Las células de destino deben ser reconocidas por el sitio que se une al antígeno de la molécula de diacuerpo que se analizará.

[00297] El ensayo de ADCCse basa en la capacidad de células NK de mediar la muerte celular por medio de una vía apoptótica. Las ccélulas NK median la muerte celular en parte por el reconocimiento de FcγRIIIA de un dominio Fc de IgG unido a un antígeno sobre una superficie celular. Se realizaron ensayos ADCC usados de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser ensayos de base radiactiva o ensayos de base fluorescente. El ensayo de ADCC usado para caracterizar las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprende marcar las células de destino, *por ej.*, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, células de Daudi, células de destino opsonizadas con un anticuerpo que reconoce un receptor de la superficie celular on la célula de destino por medio de su sitio de unión al antígeno;

combinar las células de destino opsonizadas rotuladas y la célula generadora de respuestas en una proporción apropiada, que pueden determinarse por experimentación de rutina; cosecha de células; detectar el rótulo en el sobrenadante de las células de destino lisadas, con el uso de un esquema de detección apropiado en base al rótulo usado. Las células de destino pueden rotularse en forma indistinta con un rótulo radiactivo o un rótulo fluorescente, con el uso de métodos estándar conocidos en la materia. Por ejemplo los rótulos incluyen, aunque no se limitan a, $[^{51}Cr]Na_2CrO_4$; y el éster de acetoximetilo del ligando potenciador de fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA).

[00298] En una realización específica, un ensayo fluorimétrico resuelto con el tiempo se usa para medir la actividad de ADCC contra las células blanco que se han marcado con el éster de acetoximetilo del ligando potenciador de fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato (TDA). Dichos ensayos fluorimétricos se conocen en la materia, *por ej*., véase, Blomberg *et al*. (1996) *"Time-Resolved Fluorometric Assay For Natural Killer Activity Using Target Cells Labelled With A Fluorescence Enhancing Ligand,"* Journal of Immunological Methods, 193: 199-206; que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. En forma sintética, las células de destino se marcan con el diéster de acetoximetilo permeable a la membrana de TDA (bis(acetoxoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-6-6"-dicarboxilato, (BATDA), que se difunde rápidamente a través de la membrana de células viables. Las esterasas intracelulares se separan de los grupos éster y la molécula de TDA impermeable a la membrana regenerada se atrapa dentro de la célula. Después de la incubación de las células efectoras y de destino, *por ej.*, durante por lo menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37°C, bajo 5% CO_2, el TDA liberado de las células blanco lisadas se quela con con Eu3+ y la fluorescencia de los quelatos de Europio -TDA formados se cuantifica en un fluorómetro con resolución en el tiempo (*por ej*., Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

[00299] En otra realización específica, el ensayo de ADCC usado para caracterizar las moléculas de la invención que comprende multiple sitios que se unen al epítope y, en forma opcional, un dominio Fc (o porción de los anteriores) comprende los siguientes steps: Con preferencia 4-5x10^6 células de destino (*por ej*., SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, células Raji) se rotulan con bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-t-6"-dicarboxilato (DELFIA BATDA Reagent, Perkin Elmer/Wallac**).** Para lograr una óptima eficiencia de rotulado, la cantidad de células de destino usadas en el ensayo de ADCC con preferencia no deben exceder 5x10^6. El reactivo BATDA se agrega a las células y la mezcla se incuba a 37ºC con preferencia bajo 5% de CO_2, durante por lo menos 30 minutos. A continuación las células se lavan con un buffer fisiológico, *por ej*., PBS con sulfinilpirazol 0,125 mM, y medios que contienen sulfinilpirazol 0,125 mM. Las células de destino rotuladas a continuación se opsonizan (se recubren) con una molécula de la invención que comprende un dominio de unión al epítope específico para FcγRIIA y, en forma opcional, un dominio Fc (o porción de los anteriores). En realizaciones

preferidas, la molécula usada en el ensayo de ADCC también es específica para un receptor de la superficie celular, un antígeno del tumor, o un antígeno del cáncer. La molécula de diacuerpo de la invención pueden unirse en forma específica a cualquier antígeno del cáncer o del tumor, tales como aquellos enumerados en la sección 5.6.1. Las células de destino en el ensayo de ADCC se eligen de acuerdo con los sitios que se unen al epítope diseñados en el diacuerpo de la invención, de manera tal que el diacuerpo se une a un receptor de la superficie celular de la célula de destino específicamente.

[00300] Las células de destino se agregan a células efectoras, *por ej.,* PBMC, para producir proporciones de efector:destino de aproximadamente 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1, o 100:1. Las células efectoras y de destino se incuban durante por lo menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37°C, bajo 5% de CO_2. Los sobrenadantes de células se cosechan y se agregan a una solución ácida de europio (*por ej.*, DELFIA Europium Solution, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de Europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro con resolución en el tiempo (*por ej*., Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La máxima liberación (MR) y la liberación espontánea (SR) se determinan por incubación de las células de destino con 1% TX-100 y medios solos, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente del anticuerpo (AICC) se mide por incubación de células efectoras y de destino en ausencia de una molécula de análisis, *por ej.*, diacuerpo de la invención. Cada ensayo se realiza con preferencia por triplicado. El porcentaje promedio de lisis específica se calcula como: Liberación experimental (ADCC) - AICC)/(MR-SR) x 100.

[00301] La invención abarca ensayos conocidos en la materia, y ejemplificados en este documento, para caracterizar la unión de C1q y mediación de citotixicidad que depende de los complementos (CDC) por moléculas de la invención que comprenden dominios Fc (or porciones de los anteriores). Para determinar la unión a C1q, un ELISA de C1q de la unión puede realizarse. Un ensayo ejemplificativo pueden comprender los siguientes: placas de ensayo pueden recubrirse durante toda la noche a 4ºC con polipéptido que comprende una molécula de la invención o polipéptido de inicio (control) en un buffer de recubrimiento. La placas a continuación pueden lavarse y bloquearse. Luego del lavado, una alícuota de C1q humana puede agregarse a cada pocillo e incubarse durante 2 hrs a temperatura ambiente. Luego de un lavado adicional, 100 uL de un anticuerpo conjugado con peroxidasa de C1q anti-complemento de oveja puede agregarse a cada pocillo e incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa puede lavarse nuevamente con buffer de lavado y 100 ul de buffer de sustrato que contiene OPD (Diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma)) puede agregarse a cada pocillo. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, puede dejarse proceder durante 30 minutos y detenerse por la incorporación de 100 ul de 4,5 NH2 SO4. La absorbancia puede leerse entonces a (492-405) nm.

[00302] Para evaluar la activación de complementos, puede realizarse un ensayo de citotixicidad que depende de los complementos (CDC), *por ej*. como se describe en Gazzano-

Santoro *et al.* (1997) *"A Non-Radioactive Complement-Dependent Cytotoxicity Assay For Anti-CD20 Monoclonal Antibody,"* J. Immunol. Métodos 202:163-171, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. En forma sintética, varias concentraciones de la molécula que comprende un dominio Fc (variante) (o porción de los anteriores) y complemento humano puede diluirse con buffer. Las células que expresan el antígeno al cual la molécula de diacuerpo se une pueden diluirse hasta una densidad de alrededor de $1x10^6$ células/ml. Las mezclas de las moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc (variante) (o porción de los anteriores), complemento humano diluido y células que expresan el antígeno pueden agregarse a una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de base plana y se dejó incubar durante 2 hrs a 37°C. y 5% CO2 para facilitar la lisis celular mediada por complementos. 50 uL de azul de alamar (Accumed International) pueden agregarse luego a cada pocillo e incubarse durante toda la noche a 37°C. La absorbancia se mide con el uso de un fluorómetro de 96 pocillos con excitation a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Las concentraciones de muestra pueden computarse a partir de una curva estándar y el porcentaje de actividad se compara con la molécula no variante, es decir, una molécula no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc no variante, se informa para la variante de interés.

5.3.3 OTROS ENSAYOS

[00303] Las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, un dominio Fc puede evaluarse con el uso de cualquier ensayo basado en resonancia plasmónica de superficie conocidos en la materia para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión al antígeno o unión a Fc-FcγR. Cualquier instrumento de SPR disponible en el mercadoque incluyen, aunque sin limitarse a, instrumentos de BIAcore, disponible de Biacore AB (Uppsala, Sueca); instrumentos IAsys disponible de Affinity Sensors (Franklin, MA.); Sistema IBIS disponible de Windsor Scientific Limited (Berks, UK), Sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japan), y SPR Detector Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, TX) puede usarse en la presente invención. Para obtener una revisión de la tecnología basada en SPR véase Mullet *et al.* (2000) *"Plasmon Surface Resonance -Based Inmunoassays,"* Métodos 22: 77-91; Dong *et al.* (2002) *"Some new aspects in biosensors,"* Reviews in Mol. Biotech. 82: 303-23; Fivash *et al.* (1998) *"BIAcore For Macromolecular Interaction,"* Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich *et al.* (2000) *"Advances In Plasmon Surface Resonance Biosensor Analysis,"* Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61; la totalidad de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. En forma adicional, cualquiera de los instrumentos SPR y métodos basados SPR para la medición de interacciones proteína-proteína interacciones descritos en las Patentes de EE UU Nros. 6,373,577; 6,289,286; 5,322,798; 5,341,215; 6,268,125, la totalidad de las

cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad, se contemplan en los métodos de la invención.

[00304] En forma sintética, ensayos basados en SPR incluyen inmovilizar un miembro de un par de unión en una superficie, y monitorear su interaction con el otro miembro del par de unión en solución en tiempo real. SPR se basa en la medición del cambio en el índice refractivo del solvente cerca de la superficie que ocurre luego de la formación o disociación de complejos. The surface onto which the immobilization occurs is the sensor chip, which is at the heart of the SPR technology; it consists of a glass surface coated con a thin layer of gold and forms the basis for a range of specialized surfaces designed to optimize la unión de una molécula to the surface. Una variedad de sensor chips are disponible en el mercadoen especial from the companies listed *supra*, all of which may be usados en los métodos de la invención. Algunos ejemplos de sensor chips incluyen those disponible de BIAcore AB, Inc., *por ej*., Sensor Chip CM5, SA, NTA, y HPA. Una molécula de la invención may be immobilized onto the surface of a sensor chip con el uso de any of the immobilization métodos and chemistries conocidos en la materia, que incluyen aunque sin limitarse a, direct covalent coupling por medio de amine groups, direct covalent coupling por medio de sulfhydryl groups, biotin attachment to avidin coated surface, aldehyde coupling to carbohydrate groups, y attachment through the histidine tag con NTA chips.

[00305] En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de moléculas de la invención que comprende multiple sitios que se unen al epítope y, en forma opcional, y Fc domain, a un antígeno o un FcγR puede determinarse con el uso de un instrumento BIAcore (*por ej*., BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Como se discutió con anterioridad, remitirse a la sección 5.4.1, cualquier FcγR puede usarse para evaluar la unión de las moléculas de la invención en forma indistinta donde por lo menos un sitio de unión al epítope de la molécula de diacuerpo reconoce en forma inmunoespecífica un FcγR, y/o donde la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o porción de los anteriores). En una realización específica el FcγR es FcγRIIIA, con preferencia un FcγRIIIA monomérico soluble. Por ejemplo, en una realización, el FcγRIIIA monomérico soluble es la región extracelular de FcγRIIIA unido a la secuencia AVITAG-ligadura (véase, Solicitud Provisional de EE UU Nro. 60/439,498, presentada el 9 de enero de 2003 y Solicitud Provisional de EE UU Nro. 60/456,041 presentada el 19 de marzo de 2003, las cuales se incorporan en este documento a modo de referencia en sus totalidades). En otra realización específica, el FcγR es FcγRIIB, con preferencia un FcγRIIB dimérico soluble. Por ejemplo en una realización, la proteína FcγRIIB dimérico soluble se prepara de acuerdo con la metodología que se describe en la Solicitud Provisional de EE UU Nro. 60/439,709 presentada el 13 de enero de 2003, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00306] Para todos los ensayos inmunológicos, el reconocimiento de/la unión a FcγR por una molécula de la invención puede efectuarse por múltiples dominios: en ciertas realizaciones,

las moléculas de la invención reconocen en forma inmunoespecífica un FcγR por medio de uno de los múltiples dominios que se unen al epítope; incluso, en otras realizaciones, donde la molécula de la invención comprende un dominio Fc (o porción de los anteriores), la molécula de diacuerpo pueden reconocer en forma inmunoespecífica un FcγR por medio de interacciones Fc-FcγR; incluso en otras realizaciones, donde una molécula de la invención comprende ambos, un dominio Fc (o porción de los anteriores) y un sitio que se une al epítope que reconoce en forma inmunoespecífica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede reconocer un FcγR por medio de uno o ambos de un dominio de unión al epítope y el dominio Fc (o porción de los anteriores). Un ensayo ejemplificativo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, y dominio Fc (o porción de los anteriores) a un antígeno y/o un FcγR con el uso de un instrumento BIAcore comprende los siguientes: un primer antígeno se inmoviliza sobre una de las cuatro células de flujo de una superficie del chip sensor, con preferencia a través de química de acoplamiento de amina de manera tal que alrededor de 5000 unidades de respuesta (RU) de dicho primer antígeno se inmovilizan sobre la superficie. Una vez que la superficie apropiada se prepara, las moléculas de la invención que reconocen en forma inmunoespecífica dicho primer antígeno se pasan sobre la superficie, con preferencia por inyecciones de un minuto de una solución de 20 μg/mL a un caudal de fujo de 5μl/mL. Los niveles de las moléculas de la invención unidas a la superficie en esta etapa normalmente oscila entre 400 y 700 RU. A continuación, la serie de dilución de un segundo antígeno (*por ej.*, FcγR) o receptor FcγR en buffer HBS-P (20mM HEPES, 150 mM NaCl, 3mM EDTA, pH 7,5) se inyectan sobre la superficie a 100 μL/min. La regeneración de moléculas entre diferentes diluciones de segundo antígeno o receptor se lleva a cabo con preferencia por 5 segundas inyecciones individuales de 100mM $NaHCO_3$ pH 9,4; 3M NaCl. Cualquier técnica de regeneración conocida en la materia se contempla en el método de la invención.

[00307] Una vez recolectados los datos completos, las curvas de unión resultantes se adaptan en forma global con el uso de algoritmos para computadoras provistos por el fabricante de instrumentos SPR, *por ej.*, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan ambos el K_{on} and K_{off}, del cual la constante de unión en equilibrio óptima, K_d se deduce como la proporción de las dos constantes de velocidad (*es decir*, K_{off}/K_{on}). Los tratamientos más detallados of how the individual rate constants are derived can be found in the BIAevaluaion Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). The analisis of the generated data puede realizarse con el uso de any method conocidos en la materia. Para obtener una revisión de los varios métodos de interpretación de los datos cinéticos generados véase Myszka (1997) *"Kinetic Analisis Of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors,"* Current Opinion in Biotechnology 8: 50-7; Fisher *et al.* (1994) *"Surface Plasmon Resonance Based Methods For Measuring The Kinetics And Binding Affinities Of Biomolecular Interactions,"* Current Opinion in Biotechnology 5: 389-95; O'Shannessy

(1994) *"Determination Of Kinetic Rate And Equilibrium Binding Constants For Macromolecular Interactions: A Critique Of The Surface Plasmon Resonance Literature,"* Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken *et al.* (1992) *"Analisis Of Macromolecular Interactions Using Immobilized Ligands,"* Analytical Biochemistry, 201: 197-210; Morton *et al.* (1995) *"Interpreting Complex Binding Kinetics From Optical Biosensors: A Comparison Of Analisis By Linearization, The Integrated Rate Equation, and Numerical Integration,"* Analytical Biochemistry 227: 176-85; O'Shannessy *et al.*, 1996, *Analytical Biochemistry* 236: 275-83; la totalidad de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00308] En realizaciones preferidas, los parámetros cinéticos determinados con el uso de un análisis SPR, *por ej.*, BIAcore, puede usarse como medida predictiva de cómo una molécula de la invención funcionará en un ensayo funcional, *por ej*., ADCC. Un método ejemplificativo para predecir la eficacia de una molécula de la invención basado en parámetros cinéticos obtenidos de un análisis SPR pueden comprender los siguientes: determinar los valores K_{off} para la unión de una molécula de la invención a FcγRIIIA y FcγRIIB (via un dominio de unión al epítope y/o un dominio Fc (o porción de los anteriores)); graficar (1) K_{off} (wt)/K_{off} (mut) para FcγRIIIA; (2) K_{off} (mut)/K_{off} (wt) para FcγRIIB contra los datos de ADCC. Los números mayores que uno muestran una reducción del índice de disociación para FcγRIIIA y un aumento del índice de disociación para FcγRIIB con relación al tipo salvaje; y posee una función potenciada de ADCC**.**

5.4 MÉTODOS OF PRODUCING MOLÉCULAS DE DIACUERPO DE LA INVENCIÓN

[00309] Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden producirse con el uso de una variedad de métodos muy conocidos en la materia, que incluyen la síntesis de nuevo de la proteína y la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas pueden producirse por métodos recombinantes (por ej., mutagénesis por PCR de una variante preparada anterior del polinucleótido deseado) o por síntesis de ADN en fase sólida. Usualmente se usan métodos de expresión recombinantes. En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un CD16A VH y/o VL; en otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un CD32B VH y/o VL. Debido a la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ácido nucleico codifican cada secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina, y la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión que se describen en este documento.

5.4.1 POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

[00310] La presente invención incluye, además, polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención, que incluyen los polipéptidos y los anticuerpos. Los polinucleótidos que

codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la materia.

[00311] Una vez que la secuencia de nucleótidos de las moléculas que se identifican por los métodos de la invención se determina, la secuencia de nucleótidos puede manipularse con el uso de métodos muy conocidos en la materia, *por ej.*, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis orientada al sitio, PCR, *etc.* (véase, por ejemplo, las técnicas que se describen en Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, que se incorporan ambas a modo de referencia en este documento en sus totalidades), para generar, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo por generación de sustituciones de aminoácidos, eliminaciones, y/o inserciones.

[00312] En una realización, bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la materia, pueden seleccionarsepor técnicas estándar conocidas en la materia, para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención.

5.4.2 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

[00313] Una vez que una secuencia de ácido nucleico que codifica las moléculas de la invención (*es decir*, anticuerpos) se ha obtenido, el vector para la producción de las moléculas puede producirse por medio de tecnología de ADN recombinante con el uso de técnicas muy conocidas en la materia. Los métodos que resultan conocidos para aquellas personas expertas en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación para las moléculas de la invención y señales apropiadas de control de transcripción y traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, *in vitro* técnicas de ADN recombinante, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. (Véase, por ejemplo, las técnicas que se describen en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel *et al.* eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

[00314] Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada por los métodos de la invención puede transfectarse a una célula huésped por técnicas convencionales (*por ej.*, electroporación, transfección por liposomas, y precipitación de fosfato de calcio) y las células transfectadas a continuación se cultivan por técnicas convencionales para producir las moléculas de la invención. En realizaciones específicas, la expresión de las moléculas de la invención se regula por un promotor específico de un tejido o constitutivo o inducible.

[00315] Las células huésped usadas para expresar las moléculas identificadas por los métodos de la invención pueden ser en forma indistinta células bacterianas tales como *Escherichia coli*, or, con preferencia, células eucarióticas, en especial para la expresión de molécula de

inmunoglobulina recombinante entera. En particular, células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunción con un vector tal como el elemento promotor de genes iniciales intermedios mayores de citomegalovirus humanos es un sistema de expresión efevtivo para las inmunoglobulinas (Foecking *et al.* (1986) *"Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors,"* Gene 45:101-106; Cockett *et al.* (1990) *"High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese hámster ovary cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification,"* Biotechnology 8:662-667).

[00316] Una variedad de sistemas de vector de expresión-huésped puede utilizarse para expresar las moléculas identificadas por los métodos de la invención. Dichos sistemas de expresión-huésped representan vehículos por los cuales las secuencias de codificación de las moléculas de la invención pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresar las moléculas de la invención *in situ*. Estos incluyen, aunque no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (*por ej.*, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plásmido o ADN cósmido que contienen secuencias de codificación para las moléculas identificadas por los métodos de la invención; levadura (*por ej.*, *Saccharomyces pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que codifican las moléculas identificadas por los métodos de la invención; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (*por ej.*, baclovirus) que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas por los métodos de la invención; sistemas de células vegtetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*por ej.*, virus mosaico de la coliflor (CaMV) y virus mosaico de tabaco (TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinante (*por ej.*, plásmido Ti) que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas por los métodos de la invención; o sistemas de células de mamífero (*por ej.*, células de COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (Véase U.S. 5,807,715), Células Per C,6 (células de retina humana desarrolladas por Crucell) que rodean las construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*por ej.*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (*por ej.*, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5K del virus de vaccinia).

[00317] En sistemas bacterianos, una cantidad de vectores de expresión pueden seleccionarse en forma ventajosa dependiendo del uso pretendido para la molécula expresada. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de dicha proteína desea producirse, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, los vectores que orientan la expresión de altos niveles de los productos de proteína de fusión que se purifican ampliamente pueden ser deseables. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli*

pUR278 (Rüther *et al.* (1983) *"Easy Identification Of cDNA Clones,"* EMBO J. 2:1791-1794), en la cual la secuencia de codificación del anticuerpo puede ligarse individualmene en el vector en marco con la región de codificación *lac Z* de modo tal que la proteína de fusión se produce; vectores pIN (Inouye *et al.* (1985) *"Up-Promoter Mutations In The lpp Gene Of Escherichia Coli,"* Nucleic Acid Res. 13:3101-3110; Van Heeke *et al.* (1989) *"Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia Coli,"* J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. los vctores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extranjeros como proteínas de fusión con glutationa S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse ampliamente a partir de células lisadas por absorción y unión a una matriz de perlas de glutationa-agarosa seguido de elución en la presencia de glutationa libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir trombina o sitios de separación de la proteasa del factor Xa con el fin de que el producto génico de destino clonado pueda liberarse de un resto GST.

[00318] En un sistema de insectos, el virus de polihedrosis uclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar genes extranjeros. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede clonarse en forma individual en regiones no esenciales (*por ej.*, gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (*por ej.*, el promotor de polihedrina).

[00319] En células huésped de mamífero, una cantidad de sistemas de expresión con base viral puede utilizarse. En casos en los cuales un adenovirus se usa como vector de expresión, la secuencia de codificación del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/ traducción del adenovirus, *por ej.*, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (*por ej.*, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (*por ej.*, véase Logan *et al.* (1984) *"Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). Las señales de iniciación específicas también pueden requerirse para la traducción eficiente de las secuencias de codificación insertadas del anticuerpo. Estas señales incluyen codón de iniciación de ATG y secuencias adyacentes. En forma adicional, el codón de iniciación debe ser en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Estas señales de control de traducción exógena y los codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse por lainclusión de elementos potenciadores de transcripción apropiados, terminadores de transcripción, *etc.* (Véase Bitter *et al.* (1987) *"Expresión y Secretion Vectors For Yeast,"* Methods in Enzymol. 153:516-544).

[00320] Además, una cepa de célula huésped puede elegirse que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en el modo deseado específico. Dichas modificaciones (*por ej.*, glicosilación) y procesamiento (*por ej.*, cleavage) de productos de proteínas pueden ser importantes para la función de la proteína. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una molécula del diacuerpo de la invención puede expresarse como un producto génico simple (*por ej.*, como cadena de polipéptido simple, *es decir*, como un Precursor de Poliproteínas), que requiere la descomposición proteolítica por mecanismos celulares nativos o recombinantes para formar los polipéptidos separados de las moléculas de diacuerpo de la invención. La invención abarca de este modo diseñar una secuencia de ácido nucleico para codificar una molécula precursora de poliproteínas que comprende los polipéptidos de la invención, que incluye secuencias de codificación capaces de dirigir la disociación post translacional de dicho precursor de poliproteínas. La disociación post translacional del precursor de poliproteínas produce los polipéptidos de la invención. La disociación post translacional de la molécula precursora que comprende los polipéptidos de la invención puede ocurrir *in vivo* (*es decir*, dentro de la célula huésped por sistemas/mecanismos de células recombinantes o nativos, *por ej.* separación de furina en un sitio apropiado) o puede ocurrir *in vitro* (*por ej.* incubación de dicha cadena de polipéptido en una composición que comprende proteasas o peptidasas de actividad conocida y/o en una composición que comprende condiciones o reactivos conocido por impulsar la acción proteolítica deseada). La purificación y modificación de proteínas recombinantes es muy conocida en la materia de manera tal que el diseño del precursor de poliproteínas podrían incluir una cantidad de realizaciones ampliamente apreciadas por un trabajador capacitado. Cualquier proteasa o peptidasa conocida en la materia puede usarse para la modificación descrita de la molécula precursora, *por ej.*, trombina (que reconoce la secuencia de aminoácidos LVPR^GS **(SEC ID NRO.: 89)**), o factor Xa (que reconoce la secuencia de aminoácidos I(E/D)GR^ **(SEC ID NRO.: 90)** (Nagai *et al.* (1985) *"Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli,"* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7252-7255, y revisado en Jenny *et al.* (2003) *"A Critical Review Of Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa,"* Protein Expr. Purif. 31:1-11, cada una de las cuales se incorpora a modo de referencia en este documento en su totalidad)), enteroquinasa (que reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK^ **(SEC ID NRO.: 91)** (Collins-Racie *et al.* (1995) *"Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA,"* Biotechnology 13:982-987 incorporada en este documento en su totalidad a modo de referencia)), furina (que reconoce la secuencia de aminoácidos RXXR^, con una preferencia por RX(K/R)R^ **(SEC ID NRO.: 92 y SEC ID NRO.: 93, respectivamente)** (un adicional de R en la posición P6 potencia la separación)), y AcTEV (que reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ^G **(SEC ID NRO.: 94)** (Parks *et al.* (1994) *"Release Of Proteins And*

Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase," Anal. Biochem. 216:413-417 incorporada en este documento en su totalidad a modo de referencia)) y la Proteasa del Virus de la Enfermedad de Pies y Boca C3. Véase por ejemplo, sección 6,4, *supra*.

[00321] Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-translacional y modificación de las proteínas y productos génicos. Las líneas celulares apropiadas o sistemas huésped pueden elegirse para correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Hasta este punto, pueden usarse las células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado de transcripción primaria, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen aunque no se limitan a CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

[00322] Para la producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento, a largo plazo, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan en forma estable un anticuerpo de la invención pueden diseñarse. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (*por ej.*, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, *etc.*), y un marcador seleccionable. Luego de la introducción del ADN extranjero, las células diseñadas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego es cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células se integren en forma estable al plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en las líneas celulares. Este método puede usarse en forma ventajosa para diseñar las líneas celulares que expresan los anticuerpos de la invención. Dichas líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con las moléculas de la invención.

[00323] Una cantidad de sistemas de selección puede usarse, que incluyen aunque sin limitarse a la quinasa de timidina del virus de herpes simple (Wigler *et al.* (1977) *"Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells,"* Cell 11: 223-232), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska *et al.* (1992) *"Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation of Mammalian Cells: First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Terapia génica,"* Bioessays 14: 495-500), y genes adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.* (1980) *"Isolating Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene,"* Cell 22: 817-823) pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt- cells. Además, la resistencia antimetabolito puede usarse como base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a

metotrexato (Wigler *et al.* (1980) *"Transformation of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; O'Hare *et al.* (1981) *"Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527-1531); *gpt,* que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan *et al.* (1981) *"Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076); *neo,* que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Tolstoshev (1993) *"Terapia génica, Concepts, Current Trials And Future Directions,"* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) *"The Basic Science Of Terapia génica,"* Science 260:926-932; y Morgan *et al.* (1993) *"Human Terapia génica,"* Ann. Rev. Biochem. 62:191-217) e *hygro,* que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.* (1984) *"Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromicina B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells,"* Gene 30:147-156). Los métodos comúnmente conocidos en la materia de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en Chapters 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al.* (1981) *"A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukariotic Cells,"* J. Mol. Biol. 150:1-14.

[00324] Los niveles de expresión de una molécula de la invención pueden aumentarse por amplificación del vector (para obtener una revisión, véase Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa un anticuerpo es susceptible de amplificarse, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará la cantidad de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de la molécula de diacuerpo, la producción del polipéptido también aumentará (Crouse *et al.* (1983) *"Expresión y Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes,"* Mol. Cell. Biol. 3:257-266).

[00325] La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector codifica el primer polipéptido de la molécula de diacuerpo y el segundo vector codifica el segundo polipéptido de la molécula de diacuerpo. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de ambos polipéptidos. En forma alternativa, un vector simple puede usarse que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias de codificación los polipéptidos de las moléculas de la invención pueden comprender cDNA o ADN genómico.

[00326] Una vez que una molécula de la invención (*es decir*, diacuerpos) se ha expresado en forma recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la materia para purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos (*por ej*., análogos a los esquemas de purificación del anticuerpo basados en la selectividad con el antígeno) por ejemplo, por cromatografía (*por ej*., intercambio de iones, afinidad, en particular por afinidad por el antígeno específico (en forma opcional después de la selección de la Proteína A donde la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o porción de los anteriores)), y cromatografía en columna por tamaño), centrifugado, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos.

5.5 MÉTODOS TERAPÉUTICOS Y PROFILÁCTICOS

[00327] Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde una función de la célula efectora (*por ej*., ADCC) mediada por FcγR se desea (*por ej*., cáncer, enfermedad infecciosa). Como se discutió con anterioridad, los diacuerpos de la invención pueden exhibir funcionalidad similar al anticuerpo al generar función efectora aunque la molécula de diacuerpo no comprende un dominio Fc. Al comprender por lo menos un dominio de unión al epítope que reconoce en forma inmunoespecífica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede exibir unión a FcγR y actividad análoga a interacciones Fc-FcγR. Por ejemplo, las moléculas de la invención pueden unirse a un antígeno de la superficie de la célula y un FcγR (*por ej*., FcγRIIIA) en una célula efectora inmune (*por ej*., célula NK), estimular una función efectora (*por ej*., ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) contra dicha célula.

[00328] En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo de la invención comprende un dominio Fc (o porción de los anteriores). En dichas realizaciones, el dominio Fc puede comprender en forma adicional por lo menos una modificación de aminoácido con relación a un dominio Fc de tipo salvaje (o porción de los anteriores) y/o puede comprender dominios de uno o más isotipos IgG (*por ej*., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de la invención que comprenden dominios variantes Fc pueden exhibir fenotipos conferidos o alterados con relación una moléculas que comprenden el dominio Fc tipo salvaje tales como una actividad alterada o conferida de la función efectora (*por ej.*, según se evalúa en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófago). In said realizaciones, las moléculas de la invención con actividad conferida o alterada de la función efectora son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde an enhanced efficacy of la actividad de la función efectora se desea. En ciertas realizaciones, las moléculas de diacuerpo de la invención que comprende un dominio Fc (o porción de los anteriores) median la cascada que depende de los complementos. Los dominios variantes Fc identificados como aquellos que alteran la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE UU 2005/0037000 y 2005/0064514, Solicitudes Provisionales de los EE UU 60/626,510, presentada el 10 de noviembre de 2004,

60/636,663, presentada el 15 de diciembre de 2004, y 60/781,564, presentada el 10 de marzo de 2006, y Solicitudes de Patentes de EE UU 11/271,140, presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305,787, presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los Inventores, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

[00329] La invención abarca métodos y composiciones para el tratamiento, prevención o manejo de un cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más moléculas que comprenden uno o más sitios que se unen al epítope, y en forma opcional, un dominio Fc (o porción de los anteriores) diseñados de acuerdo con la invención, cuya molécula se une en forma adicional a un antígeno del cáncer. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para la prevención, inhibición, reducción del crecimiento o regresión de tumores primarios, metástasis de células cancerosas, y enfermedades infecciosas. Aunque sin intención de ligarse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de la invención median la función efectora lo que produce depuración del tumor, reducción del tumor o una combinación de los anteriores. En realizaciones alternativas, los diacuerpos de la invención median la actividad terapéutica por entrecruzamiento de antígenos de la superficie celular y/o receptores y apoptosis mejorada o negativa señalización regulatoria del crecimiento.

[00330] Aunque sin intención de ligarse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de diacuerpo de la invención exhiben potenciada eficacia terapéutica con relación a anticuerpos terapéuticos conocidos en la materia, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo de unirse inmunológicamente en forma específica a una célula blanco que expresa un antígeno particular (*por ej.*, FcγR) en niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la habilidad del diacuerpo de permanecer sobre la célula de destino más tiempo debido a una mejorada avidez de la interacción diacuerpo-epítope.

[00331] Los diacuerpos de la invención con afinidad potenciada y la avidez por los antígenos (*por ej.*, FcγRs) son particularmente útiles para el tratamiento, prevención o manejo de un cáncer, u otra enfermedad o trastorno, en un sujeto, en donde los FcγRs se expresan en bajos niveles en las poblaciones de células de destino. Como se usa en este documento, la expresión de FcγR en las células se define en términos de la densidad de dichas moléculas por célula según se mide con el uso de métodos comunes conocidos por aquellas personas expertas en la materia. Las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios que se unen al epítope y, en forma opcional, y FcγR (o porción de los anteriores) con preferencia también tienen una avidez conferida o potenciada y afinidad y/o función efectora en las células que expresan un antígeno de destino, *por ej.*, un antígeno del cáncer, a una densidad de 30.000 hasta 20.000 moléculas/célula, a una densidad de 20.000 hasta 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 moléculas/célula o menos, a una densidad de 5000 moléculas/célula o menos, o a una densidad de 1000 moléculas /cell o menos. Las moléculas de la invención tienen utilidad particular en el tratamiento, prevención o manejo de una enfermedad o un

trastorno, tales como cáncer, en una sub-población, en donde el antígeno de destino se expresa en bajos niveles en la población de células de destino.

[00332] Las moléculas de la invención también pueden utilizarse en forma ventajosa en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos en la materia para el tratamiento o la prevención de enfermedades, tales como cáncer, enfermedad autoinmune, trastornos inflamatorios, y enfermedades infecciosas. En una realización específica, las moléculas de la invención may be used en combinación con monoclonal o anticuerpos quiméricos, linfoquinas, o factores del crecimiento hematopoyético (tales como, *por ej.*, IL-2, IL-3 y IL-7), los cuales, por ejemplo, sirven para aumentar la cantidad o la actividad de células efectoras que interactúan con las moléculas y, aumentan la respuesta inmunológica**.** Las moléculas de la invención también pueden utilizarse en forma ventajosa en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tales como, por ejemplo agentes contra el cáncer, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales, *por ej.*, como se detalla en la Sección 5,7.

5.5.1 CÁNCERES

[00333] La invención abarca métodos y composiciones para el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más moléculas que comprenden múltiples dominios que se unen al epítope. En algunas realizaciones, la invención abarca métodos y composiciones para el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto con polimorfismos de FcγR tales como aquellos homócigos para los alelos FγRIIIA-158V o FcγRIIIA-158F. En algunas realizaciones, la invención abarca diseñar por lo menos un dominio de unión al epítope de la molécula de diacuerpo para unirse inmunológicamente en forma específica a FcγRIIIA (158F). En otras realizaciones, la invención abarca diseñar por lo menos un dominio de unión al epítope de la molécula de diacuerpo para unirse inmunológicamente en forma específica a FcγRIIIA (158V).

[00334] La eficacia de la terapia estándar con anticuerpo monoclonal depende del polimorfismo FcγR del sujeto (Cartron *et al.* (2002) *"Therapeutic Activity Of Humanized Monoclonal Antibody anti-CD20 And Polimorphism In IgG Fc Receptor FcRIIIa Gene,"* Blood 99: 754-758; Weng *et al.* (2003) *"Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polimorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma,"* J Clin Oncol. 21(21):3940-3947, ambas de las cuales se incorporan en este documento a modo de referencia en sus totalidades). Estos receptores se expresan sobre la superficie de la célula generadora de respuestas y mediante ADCC. Los alelos de alta afinidad, de los receptores de activación de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células generadoras de respuesta de mediar ADCC. En contraste con basarse en interacciones Fc-FcγR para efectuar función efectora, los métodos de la invención abarcan diseñar moléculas para reconocer en forma inmunoespecífica los receptores de activación de baja afinidad,

permitiendo que las moléculas estén diseñadas para un polimorfismo específico. En forma alternativa o en forma adicional, la molécula de la invención puede diseñarse para comprender un dominio Fc variante que exhibe potenciada afinidad por FcγR (con relación a un dominio tipo salvaje) sobre células efectoras. Las moléculas diseñadas de la invención proveen mejores reactivos de inmunoterapia para los pacientes sin importar su polimorfismo de FcγR.

[00335] Las moléculas de diacuerpo diseñadas de acuerdo con la invención se analizan por ADCC con el uso de cualquiera de una línea de células cultivadas o células PMBC derivadas del paciente para determinar la capacidad de las mutaciones de Fc para potenciar ADCC. El ADCC estándar se realiza con el uso de métodos divulgados en este documento. Los linfocitos se cosechan de sangre periférica con el uso de un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células de destino, *es decir,* líneas celulares o células derivadas de pacientes, se cargan con Europio (PerkinElmer) y se incuban con efectores durante 4 hrs a 37°C. El Europio liberado se detecta con el uso de un lector de placa fluorescente (Wallac). Los datos de ADCC resultantes indican la eficacia de las moléculas de la invención para detectar la citotoxicidad mediada por células NK y establecer qué moléculas pueden evaluarse con ambas muestras de pacientes y monocitos elutriados. Las moléculas de diacuerpo que muestran el mayor potencial de generar la actividad de ADCC luego se evalúan en un ensayo ADCC con el uso de PBMCs de pacientes. Las PBMC de donantes sanos se usan como células efectoras.

[00336] De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona métodos para prevenir o tratar el cáncer caracterizados por un antígeno del cáncer al diseñar la molécula de diacuerpo para reconocer en forma inmunoespecífica dicho antígeno del cáncer de manera tal que la molécula de diacuerpo sea en sí misma citotóxica (*por ej.*, por medio del entrecruzamiento de receptores de superficie que conduce a aumento de la apoptosis o desregulación de señales proliferativas) y/o comprende un dominio Fc, de acuerdo con la invención, y/o media una o más funciones efectoras (*por ej.*, ADCC, fagocitosis). Los diacuerpos que se han diseñado de acuerdo con la invención son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, dado que tienen una actividad citotóxica (*por ej.*, mayor matanza de células tumorales y/o mayor actividad, por ejemplo, actividad de de ADCC o CDC).

[00337] Los cánceres asociados con un antígeno del cáncer pueden tratarse o prevenirse por administración de un diacuerpo que se une un antígeno del cáncer y es citotóxico, y/o se ha diseñado de acuerdo con los métodos de la invención para exhibir función efectora. Por ejemplo, aunque no a modo de limitación, los cánceres asociados con los siguientes antígenos del cáncer pueden tratarse o prevenirse por los métodos y composiciones de la invención: Antígeno del carcinoma pan KS 1/4 (Perez *et al.* (1989) *"Isolation And Caracterization of A Cdna Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,"* J. Immunol. 142:3662-3667; Möller *et al.* (1991) *"Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma*

Cells By Activated Human T Lymphocytes," Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.* (1991) *"Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants,"* Cancer Res. 51(2):468-475), fosfato de ácido prostático (Tailor *et al.* (1990) *"Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone,"* Nucl. Acids Res. 18(16):4928), antígeno específico de la próstata (Henttu *et al.* (1989) *"cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes,"* Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli *et al.* (1993) *"Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen,"* Cancer Res. 53:227-230), antigen p97 asociado con melanoma (Estin *et al.* (1989) *"Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97,"* J. Natl. Cáncer Instit. 81(6):445-454), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl *et al.* (1990) *"The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product,"* J. Exp. Med. 171(4):1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.* (1987) *"Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140,240 y Its Possible Prognostic Significance,"* Cancer 59:55-63; Mittelman *et al.* (1990) *"Active Specific Immunotherapy En pacientes Con Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies,"* J. Clin. Invest. 86:2136-2144)), antígeno específico de la membrana prostática, antígeno carbinoembriónico (CEA) (Foon *et al.* (1995) *"Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine,"* J. Clin. Invest. 96(1):334-42), antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno de globulo de grasa de leche humana, Antígenos asociados con el tumor colo-rectal tales como: CEA, TAG-72 (Yokota *et al.* (1992) *"Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms,"* Cancer Res. 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar *et al.* (1993) *"Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF En pacientes With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced,"* Int. J. Cáncer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.* (1982) *"Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, and Pancreatic Carcinoma,"* J. Clin. Immunol. 2:135-140), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie *et al.* (1994) *"Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest,"* Blood 83:1329-1336), antígeno de linfoma B humano CD20 (Reff *et al.* (1994) *"Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20,"* Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros *et al.* (1993) *"Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia,"* J.

Nucl. Med. 34:422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliosida GD2 (Saleh *et al.* (1993) "*Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen,"* J.Immunol., 151, 3390-3398), gangliosida GD3 (Shitara *et al.* (1993) "*A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities,"* Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliosida GM2 (Livingston *et al.* (1994) "*Improved Survival In Stage III Melanoma Patients Con GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination Con GM2 Ganglioside,"* J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), gangliosida GM3 (Hoon *et al.* (1993) "*Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers,"* Cancer Res. 53:5244-5250), tipo de transplante específico del tumor de antígeno de superficie celular (TSTA) tales como antígenos de tumores inducidos por virus que incluyen virus de tumor de ADN de antígeno T y antígenos de envoltura de virus de ARN del tumor, fetoproteína alfa de antígeno oncofetal tales como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vesícula (Hellström *et al.* (1985) "*Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas,"* Cancer. Res. 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tales como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellström *et al.* (1986) "*Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma,"* Cancer Res. 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988) "*Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Caracterización de A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, y Ab3),"* J. Immunol. 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno del cáncer de mama tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 ($p185^{HER2}$), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.* (1992) "*Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property,"* Trends in Biochem. Sci. 17:359-363), antígeno APO-1 de linfocitos humano maligno (Trauth *et al.* (1989) "*Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis,"* Science 245:301-304), antígeno de diferenciación (Feizi (1985) "*Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteínas And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens,"* Nature 314:53-57) tales como antígeno I encontrado en eritrocitos de feto y endoderma primario, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 encontrado en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, y $D_1$56-22 encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, Y hapten, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), EGF receptor encontrado en células A431, serue E_1 (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, FC10,2 encontrado en células de carcinoma de embrión, gastric adenocarcinoma, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor EGF, (grupo sanguíneo

ALe^b/Le^y) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19,9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T_5A_7 encontrado en células mieloides, R_{24} encontrado en melanoma, 4,2, G_{D3}, D1,1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma de embrión y SSEA-3, SSEA-4 encontrado en embriones de etapa de célula 4-8. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma de células T cutáneas (Véase Edelson (1998) *"Cutaneous T Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy,"* Cáncer J Sci Am. 4:62-71).

[00338] Los Cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse por los métodos y las composiciones de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, los siguientes: Leucemias que incluyen, aunque sin limitarse a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como aunque sin limitarse a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células capilares; policitemia vera; linfomas tales como aunque sin limitarse a enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin; mielomas múltiples tales como aunque sin limitarse a mieloma múltiple latente, mieloma no secretorio, mieloma osteoartrítico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gamopatía monoclonal de importancia indeterminada; gamopatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas de tejido conectivo y óseo tales como aunque sin limitarse a sarcoma de huesos, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de células gigantes malignas, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma periosteal, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores de cerebro que incluyen aunque sin limitarse a, glioma, astrocitoma, glioma de encéfalo, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craniofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, aunque sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget enfermedad, y cáncer de mama inflamatorio; cáncer adrenal, que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma de feocromocitoma y adrenocortical; cáncer de tiroides tales como aunque sin limitarse a cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer medular de tiroides y cáncer anaplástico de tiroides; cáncer pancreático, que incluyen aunque sin limitarse a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y tumor de células carcinoides o islote; cánceres pituitarios que incluyen aunque sin limitarse a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia, y diabetes insipidus; cánceres de ojos que incluyen aunque sin limitarse a, melanoma ocular tales como melanoma

de iris, melanoma coroidal, y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales, que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y melanoma; cáncer vulvar, que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma, y enfermedad de Paget; cánceres cervicales que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, y adenocarcinoma; cánceres de útero que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma de endometrio y sarcoma de útero; cánceres de ovario que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma epitelial de ovario, tumor de borderline, tumor de células germinales, y tumor estromal; cánceres de esófago que incluyen aunque sin limitarse a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma cíctio adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrucoso, y carcinoma de célula cebada (célula pequeña); cánceres de estómago que incluyen aunque sin limitarse a, adenocarcinoma, fúngico (polipoide), ulcerante, de contagio superficial, de contagio difuso, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma, y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado que incluyen aunque sin limitarse a carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar que incluyen aunque sin limitarse a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas que incluyen aunque sin limitarse a, papilares, nodulares y difusos; cánceres de pulmón que incluyen aunque sin limitarse a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes, y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres de testículos que incluyen aunque sin limitarse a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrional, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco gestacional), cánceres de próstata que incluyen aunque sin limitarse a, adenocarcinoma, leiomiosarcoma, y rabdomiosarcoma; cánceres penales; cánceres orales que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de la glándula salival que incluyen aunque sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide, y carcinoma adenoidquístico; cánceres de faringe que incluyen aunque sin limitarse a, cáncer de células escamosas, y verrucosas; cánceres cutáneos que incluyen aunque sin limitarse a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de contagio superficial, melanoma nodular, melanoma maligno de lentigo, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón que incluyen aunque sin limitarse a, cánceres de células renales, adenocarcinoma, hipernefroma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/o uretra); rumor de Wilms; cánceres de vesícula que incluyen aunque sin limitarse a, carinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas

cebáceas, carcinoma papilar adenocarcinomas papilares (para obtener una revisión de dichos trastornos, *véase* Fishman *et al.* (1985) Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia; y Murphy *et al.* (1997) Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

[00339] De acuerdo con lo anterior, los métodos y composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales, que incluyen (aunque sin limitarse a) los siguientes: carcinoma, que incluyen el de la vesícula, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata, cuello de útero, tiroides y piel; que incluyen carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burketts; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, que incluyen leucemias mielagenosas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma y rabdomioscarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosafcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y other tumores, que incluyen melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. Se contempla además que los cánceres causados por aberraciones en la apoptosis también se tratarían por los métodos y composiciones de la invención. Dichos cánceres pueden incluir aunque no se limitan a linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones p53, tumores de la mama, próstata y ovario que dependen de las hormonas, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar, y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los cambios de la enfermedad o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos, se tratan o se previenen por los métodos y composiciones de la invención en el ovario, vesícula, mama, colon, pulmón, piel, páncreas, o útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, melanoma, o la leucemia se trata o se previene por los métodos y composiciones de la invención.

[00340] En una realización específica, una molécula de la invención (*por ej.*, un diacuerpo que comprende múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, y dominio Fc (o porción de los anteriores)) inhibe o reduce el crecimiento de células cancerosas en por lo menos 99%, por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, por lo menos 50%, por lo menos 45%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 35%, por lo menos 30%, por lo menos 25%, por lo menos 20%, o por lo menos 10% con relación al crecimiento de células cancerosas en ausencia de dicha molécula de la invención.

[00341] En una realización específica, una molécula de la invención (*por ej.*, un diacuerpo que comprende múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, y dominio Fc (o porción de los anteriores)) mata células o inhibe o reduce el crecimiento de células cancerosas por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 100% mejor que la molécula de origen.

5.5.2 ENFERMEDAD AUTOINMUNE Y ENFERMEDAD INFLAMATORIAS

[00342] En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden un dominio de unión al epítope específica para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante (o porción de los anteriores), diseñados de acuerdo con métodos de la invención, cuyo dominio Fc exhibe mayor afinidad por FcγRIIB y reducida afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA con relación a un dominio Fc tipo salvaje. Las moléculas de la invención con dichas características de unión son útiles en la regulación de la respuesta inmune, *por ej.*, en la inhibición de la respuesta inmunológica en conexión con enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Aunque no se pretende obligarse a ningún mecanismo de acción, las moléculas de la invención con una afinidad por FcγRIIB y/o que comprende un dominio Fc con una mayor capacidad por FcγRIIB y una afinidad reducida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA puede conducir a permeabilización de la respuesta de activación a FcγR e inhibición de la capaciad de respuesta celular, y de ete modo tienen eficacia terapéutica para el tratamiento de y/o prevención de un trastorno autoinmune.

[00343] La invención también proporciona métodos para prevenir, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprende, además, administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva para terapia o profilaxis de uno o más agentes antiinflamatorios. La invención también proporciona métodos para prevenir, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con an enfermedad autoinmune que comprende, además, administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva para terapia o profilaxis de uno o más agentes moduladores inmunológicos. La Sección 5.7 proporciona algunos ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios and agente modulador inmunológicos.

[00344] Algunos ejemplos de trastornos autoinmunes que pueden tratarse administrando las moléculas de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, enfermedades autoinmunes de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide buloso, cardiomiopatía, dermatitis de enfermedad celíaca, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, Síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad

de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura de trombocitopenia idiopática (ITP), neuropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o mediada por el sistema inmunológico, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliateritis nudosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agamaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis soriática, fenómeno de Raynauld, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjögren, síndrome de stiff-man, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, takayasu arteritis, temporal arteristis/ giant cell arteritis, ulcerative colitis, uveitis, vasculitis tales como vasculitis con dermatitis herpetiformis, vitiligo, y granulomatosis de Wegener. Algunos ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, aunque no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstuctiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, shock séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, arthritis, osteolisis inflamatoriae inflamación crónica que resulta de infecciones crónicas viales o bacterianas. Como se describe en este documento en la Sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunes están asociados con una afección inflamatoria. De este modo, hay una superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunes pueden también caracterizarse como trastornos inflamatorios. Algunos ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o manejarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, aunque no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstuctiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, shock séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, arthritis, osteolisis inflamatoria, y inflamación crónica que resulta de infecciones crónicas viales o bacterianas.

[00345] Las moléculas de la invención que comprenden por lo menos un dominio de unión al epítope específica para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad reducida por FcγRIIIA también pueden usarse para reducir la inflamación experimentada por animales, en particular mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, una molécula de la invención reduce la inflamación en un animal en por lo menos 99%, por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 60%, por lo menos 50%, por lo menos 45%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 35%, por lo menos 30%, por lo menos 25%, por lo menos 20%, o por lo menos 10% con relación a la inflamación en un animal, al que no se administra dicha molécula.

[00346] Las moléculas de la invención que comprenden por lo menos un dominio de unión al epítope específica para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad reducida por FcγRIIIA también pueden usarse para prevenir el rechazo a los transplantes.

5.5.3 ENFERMEDAD INFECCIOSA

[00347] La invención abarca, además, métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico o profiláctico de una o más moléculas de la invención que comprenden por lo menos un dominio de unión al epítope específico para un agente infeccioso asociado con dicha enfermedad infecciosa. En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención son tóxicas para el agente infeccioso, potencian la respuesta inmunológica contra dicho agente o potencian la función efectora contra dicho agente, con relación a la respuesta inmunológica en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse por las moléculas de la invención son causadas por agentes infecciosos que incluyen aunque sin limitarse a virus, bacterias, hongos, protozoarios y virus.

[00348] Las enfermedades virales que pueden tratarse o prevenirse con el uso de las moléculas de la invención en conjunción con los métodos de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, aquellas causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus de papiloma, virus de papiloma, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus de coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (HIV-II), y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

[00349] Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse con el uso de las moléculas de la invención en conjunción con los métodos de la presente invención, que son causadas por bacterias incluyen, aunque no se limitan a, micobacteria rickettsia, micoplasma, neisseria, S. pneumonia, Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme), Bacillus antracis (ántrax), tétano, estreptococo, estafilococo, micobacteria, tétano, pertusis, cólera, plaga, difteria, clamidia, S. aureus y Legionella.

[00350] Las enfermedades por protozoarios que pueden tratarse o prevenirse con el uso de las moléculas de la invención en conjunción con los métodos de la presente invención, que son causadas por protozoa incluyen, aunque no se limitan a, leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria.

[00351] Las enfermedades parasíticas que pueden tratarse o prevenirse con el uso de las moléculas de la invención en conjunción con los métodos de la presente invención, que son causadas por parásitos incluyen, aunque no se limitan a, clamidia and rickettsia.

[00352] De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas de la invención que comprenden por lo menos un dominio de unión al epítope específica para un agente infeccioso exhiben un anticuerpo función efectora hacia dicho agente, *por ej*., una proteína patogénica. Algunos ejemplos de infectious agents incluyen aunque no se limitan a bacterias (*por ej., Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphilococcus aureus, Enterococcus faecials, Candida albicans, Proteus vulgaris, Staphilococcus viridans, y Pseudomonas aeruginosa),* un patógeno (*por ej*., papovavirus B-linfotrópico (LPV); Bordatella pertussis; virus de la Enfermedad de Borna (BDV); Coronavirus bovino; virus de Coriomeningitis; virus del Dengue; un virus, E. coli; Ebola; Ecovirus 1; Ecovirus-11 (EV); Endotoxina (LPS); bacterias entéricas; virus Huérfano Entérico; Enterovirus; virus de leucemia de felinos; virus de la enfermedad de pie y boca; virus de leucemia de Gibbon ape (GALV); bacterias gram negativas; Heliobacter pylori; Virus de hepatitis B (HBV); Virus de herpes simple; HIV-1; Citomegalovirus humano; coronovirus humano; Gripe A, B & C ; Legionella; Leishmania mexicana; monocitogenes de Listeria; virus de paperas; Meningococo; Morbilivirus; virus de la hepatitis de ratón; Virus de leucemia de murino; herpes virus gamma murino; retrovirus murino; virus de la hepatitis de coronavirus murino de ratón; Micobacteria aviar-M; Neisseria gonorrhoeae; virus de enfermedad de Newcastle; Parvovirus B19; Plasmodium falciparum; Poxairus; Pseudomonas; Rotavirus; Samonella typhiurium; Shigella; Streptococci; virus linfocítico de células T 1; virus de vaccinia).

5.5.4 DESINTOXICACIÓN

[00353] La invención abarca, además, métodos de desintoxicación en un sujeto expuesto a una toxina (*por ej*., una molécula tóxica del medicamento) que comprende administrar una cantidad efectiva desde el punto de vista terapéutico o profiláctico de una o más moléculas de la invención que comprenden por lo menos un dominio de unión al epítope específica para la molécula tóxica del medicamento. En ciertas realizaciones, la unión de una molécula de la invención a la toxina reduce o elimina el efecto fisiológico adverso de dicha toxina. Incluso, en otras realizaciones, la unión de un diacuerpo de la invención a la toxina aumenta o potencia la eliminación, degradación o neutralización de la toxina con relación a eliminación, degradación o neutralización en ausencia de dicho diacuerpo. La inmuno-toxicoterapia de acuerdo con los métodos de la invención pueden usarse para tratar sobresosis o exposición a fármacos que incluyen, aunque sin limitarse a, digixina, PCP, cocaína, colquicina, y antidepresivos tricíclicos.

[00354] TRATAMIENTO COMBINADO

[00355] La invención abarca, además, administrar las moléculas de la invención en combinación con otros tratamientos conocidos por aquellos expertos en la materia para el tratamiento o prevención del cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa o intoxicación, que incluyen aunque sin limitarse a, quimioterapias estándar y experimentales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, terapias con rayos, o

cirugía. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención puede administrarse en combinación con una cantidad efectiva para terapia o profilaxis de una o más agents, anticuerpos terapéuticos o otros agentes conocidos por aquellos expertos en la materia para el tratamiento y/o prevención del cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa o intoxicación.

[00356] En ciertas realizaciones, una o más moléculas de la invención se administra a un mamífero, con preferencia un humano, en forma concurrente con uno o más otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer. El término "en forma concurrente" no se limita a la administración de agentes terapéuticos o profilácticos exactamente en el mismo momento, sino más bien se refiere a que una molécula de la invención y el otro agent se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de manera tal que la molécula de la invención puede actuar junto con el otro agente para proporcionar un mayor beneficio que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (*por ej.*, quimioterapia, terapia por rayos, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse en el mismo momento o en forma consecutiva en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran en el mismo momento, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo con el fin de proveer el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en una forma apropiada y por cualquier vía apropiada. En varias realizaciones, los agentes terapéuticos o profilácticos se administran con menos de 1 hora de separación, a alrededor de 1 hora de separación, a alrededor de 1 hora hasta alrededor de 2 horas de separación, a alrededor de 2 horas hasta alrededor de 3 horas de separación, a alrededor de 3 horas hasta alrededor de 4 horas de separación, a alrededor de 4 horas hasta alrededor de 5 horas de separación, a alrededor de 5 horas hasta alrededor de 6 horas de separación, a alrededor de 6 horas hasta alrededor de 7 horas de separación, a alrededor de 7 horas hasta alrededor de 8 horas de separación, a alrededor de 8 horas hasta alrededor de 9 horas de separación, a alrededor de 9 horas hasta alrededor de 10 horas de separación, a alrededor de 10 horas hasta alrededor de 11 horas de separación, a alrededor de 11 horas hasta alrededor de 12 horas de separación, no más de 24 horas de separación o no más de 48 horas de separación. En realizaciones preferidas, dos o más components se administran dentro de la misma visita del paciente.

[00357] En otras realizaciones, los agentes terapéuticos o profilácticos se administran a alrededor de 2 a 4 días de separación, a alrededor de 4 a 6 días de separación, a alrededor de 1 semana de separación, a alrededor de 1 a 2 semanas de separación, o más de 2 semanas de separación. En realizaciones preferidas, los agentes terapéuticos o profilácticos se administran en un mismo marco donde ambos agentes aún están activos. Una persona con experiencia en la materia sería capaz de determinar dicho marco de tiempo por determinación de la vida media de los agentes administrados.

[00358] En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos o profilácticos de la invención se administran en forma cíclica a un sujeto. La terapia cíclica incluye la administración de un primer agente durante un período de tiempo, seguido de la administración de un segundo agente y/o tercer agente durante un período de tiempo y repetir esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos colaterales de una o más terapias, y/o mejora la eficacia del tratamiento.

[00359] En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos o profilácticos se administran en un ciclo de menos de alrededor de 3 semanas, alrededor de una vez cada dos semanas, alrededor de una vez cada 10 días o alrededor de una vez cada semana. Un ciclo puede comprender la administración de un agente terapéutico o profiláctico por infusión durante alrededor de 90 minutos cada ciclo, alrededor de 1 hora cada ciclo, alrededor de 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender por lo menos 1 semana de descanso, por lo menos 2 semanas de descanso, por lo menos 3 semanas de descanso. La cantidad de ciclos administrados es desde alrededor de 1 hasta alrededor de 12 ciclos, más normalmente desde alrededor de 2 hasta alrededor de 10 ciclos, y más normalmente desde alrededor de 2 hasta alrededor de 8 ciclos.

[00360] Incluso, en otras realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos de la invención se administran en regímenes de dosificación metronómicos, ya sea por infusión conitnua o administración frecuente sin períodos de descanso prolongados. Dicha administración metronómica puede incluir administración en intervalos constantes sin períodos de descanso. Normalmente los agentes terapéuticos, en particular agentes citotóxicos, se usan en dosis inferiores. Dichos regímenes de dosificación abarcan la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante períodos prolongados de tiempo. En realizaciones preferidas, el uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos colaterales tóxicos y eliminar períodos de descanso. En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran por infusión continua o de baja dosis crónica que oscila desde alrededor de 24 horas hasta alrededor de 2 días, hasta alrededor de 1 semana, hasta alrededor de 2 semanas, hasta alrededor de 3 semanas hasta alrededor de 1 mes hasta alrededor de 2 meses, hasta alrededor de 3 meses, hasta alrededor de 4 meses, hasta alrededor de 5 meses, hasta alrededor de 6 meses. El cronograma de dichos regímenes de administración puede ser optimizado por el oncólogo experimentado.

[00361] En otras realizaciones, los cursos de tratamiento se administran en forma concurrente a un mamífero, *es decir*, dosis individuales de los agentes terapéuticos se administran por separado incluso dentro de un intervalo de tiempo de manera tal que moléculas de la invención puede funcionar junto con el otro agente o agentes. Por ejemplo, un componente puede administrarse una vez por semana en combinación con los otros componentes que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes de dosificación para los agentes terapéuticos se llevan a cabo en

forma concurrente incluso si los agentes terapéuticos no se administran en forma simultánea o dentro de la misma visita del paciente.

[00362] Cuando se usan en combinación con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, las moléculas de la invención y el agente profiláctico y/o terapéutico puede actuar en forma agregada o, con mayor preferencia, sinérgica. En una realización, una molécula de la invención se administra en forma concurrente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. En otra realización, una molécula de la invención se administra en forma concurrente con uno o más otros agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas separadas. Incluso en otra realización, una molécula de la invención se administra antes de o después de la administración de otro agente terapéutico o profiláctico. La invención contempla la administración de una molécula de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos o profilácticos por la misma o diferentes vías de administración, *por ej*., oral y parenteral. En ciertas realizaciones, cuando una molécula de la invención se administra en forma concurrente con otro agente profiláctico o terapéutico que produce potencialmente efectos colaterales adversos que incluyen, aunque sin limitarse a, toxicidad, el agente terapéutico o profiláctico puede administrarse en forma ventajosa a una dosis que cae por debajo del umbral que se general el efecto colateral adverso.

[00363] Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración provistas en este documento están abarcadas por los términos terapéuticamente efectiva y profilácticamente efectiva. La dosificación y frecuencia variarán además normalmente de acuerdo con factores específicos para cada paciente dependiente de los agentes profilácticos o terapéuticos específicos administrados, la severidad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como también edad, peso corporal, respuesta, y la historia clínica del paciente. Los regímenes apropiados pueden ser seleccionados por una persona con experiencia en la materia considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones informadas en la literatura y recomendadas en el Physician's Desk Reference (56th ed., 2002).

5.5.5 AGENTES CONTRA EL CÁNCER

[00364] En una realización específica, los métodos de la invención abarcan la administración de una o más moléculas de la invención con uno o más agentes terapéuticos usados para el tratamiento y/o prevención del cáncer. En una realización, los inhibidores de angiogénesis pueden administrarse en combinación con las moléculas de la invención. Los inhibidores de angiogénesis que pueden usarse en los métodos y composiciones de la invención incluyen aunque no se limitan a: Angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina antiangiogénica III; Angiozyme; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartílago (CDI); CAI; CD59 fragmento de complemento; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); Fragmento de Fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; fragmento de Heparina hexasacárido; HMV833; Gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; Interferón alfa /beta/gamma;

proteína inducible por interferón (IP-10); Interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; Inhibidores de Metaloproteinasa (TIMPs); 2-Metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; Inhibidor de la ribonucleasa placentaria; Inhibidor de activador de plasminógenos; factor-4 de plaquetas (PF4); Prinomastat; Fragmento de Prolactina de 16kDa; Proteína relacionada con Proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; Squalamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; Trombospondin-1 (TSP-1); TNP-470; Factor beta de crecimiento por transformación (TGF-b); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de la farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.

[00365] Los agentes contra el cáncer que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención en las varias realizaciones de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la invención, incluyen, aunque no se limitan a,: acivicina; aclarubicina; acodazol clorhidrato; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; ametantrona acetato; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlin; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; bisantreno clorhidrato; bisnafida dimesilato; bizelesina; bleomicina sulfato; brequinar de sodio; bropirimina; busulfan; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; carubicin clorhidrato; carzelesin; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crisnatol mesilato; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; daunorubicin clorhidrato; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; dezaguanina mesilato; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; doxorubicina clorhidrato; droloxifeno; droloxifeno citrato; dromostanolona propionato; duazomicina; edatrexato; eflornitina clorhidrato; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; epirubicin clorhidrato; erbulozol; esorubicina clorhidrato; estramustina; estramustina fosfato de de sodio; etanidazol; etoposida; etoposide fosfato; etoprina; fadrozol clorhidrato; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracil; flurocitabina; fosquidona; fostriecin de sodio; gemcitabina; gemcitabina clorhidrato; hidroxiurea; idarubicina clorhidrato; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (que incluyen interleucina recombinante II, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1 ; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; iproplatino; irinotecan clorhidrato; lanreotida acetato; letrozol; leuprolida acetato; liarozol clorhidrato; lometrexol de sodio; lomustina; losoxantrona clorhidrato; masoprocol; maytansina; mecloretamina clorhidrato; megestrol acetato; melengestrol acetato; melfalan; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromin; mitogillin; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; mitoxantrona clorhidrato; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; omaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina sulfato; perfosfamida; pipobroman; piposulfan;

piroxantrona clorhidrato; plicamicina; plomestano; porfímero de sodio; porfiromicina; prednimustina; procarbazina clorhidrato; puromicina; puromicina clorhidrato; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; safingol clorhidrato; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; sparsomicina; espirogermanio clorhidrato; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan de sodio; tegafur; teloxantrona clorhidrato; temoporfin; teniposida; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurin; tirapazamina; toremifeno citrato; trestolona acetato; triciribina fosfato; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; tubulozol clorhidrato; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfin; vinblastina sulfato; vincristina sulfato; vindesina; vindesina sulfato; vinepidina sulfato; vinglicinato sulfato; vinleurosina sulfato; vinorelbina tartrato; vinrosidina sulfato; vinzolidina sulfato; vorozol; zeniplatino; zinostatina; zorubicina clorhidrato. Otros fármacos contra el cáncer incluyen, aunque no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesin; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; yrografolida; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína -1 morfogenética anti dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladore de la apoptosis génica; reguladores de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; desaminasa de arginina; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxin; azatirosina; derivados de bacatin III; balanol; batimastat; antagonists de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados beta lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesin; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de quinasa de caseína (ICOS); castanospermina; cecropin B; cetrorelix; clorlns; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados criptoficina A; curacin A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cypemicina; citarabina ocfosfato; cytolytic factor; cytostatin; dacliximab; decitabina; dehidrodidemnin B; deslorelina; dexamethasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemnin B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetron; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornithina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; etoposida fosfato; exemestano;

fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; fluorodaunorunicina clorhidrato; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato degallium; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutationa; hepsulfam; heregulina; hexametilena bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunostimulante; inhibidor del receptor del factor-1 de crecimiento símil insulina; agonistas de interferón; interferonas; interleucinas; iobenguano; iododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida; kahalalida F; lamellarin-N triacetato; lanreotida; leinamicina; lenograstim; lentinan sulfato; leptolstatin; letrozol; factor de inhibidor de leucemia; interferón de leucocito alfa; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico; compuestos de platino lipofílicos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; lutetium texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelin; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble hebra sin equivalencias; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; saporina-factor de crecimiento de fibroblastos de mitotoxin; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; sk de pared celular de miobacteria monofosforil lípida A+; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; Terapia basada en el supresor -1 de tumor múltiple; agente anticáncer de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared de células micobacterianas; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavin; nafterpin; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oacina; inductor de citoquina oral; omaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactin; pazelliptina; pegaspargase; peldesina; pentosan polisulfato de sodio; pentostatin; pentrozol; perflubron; perfosfamida; perilil alcohol; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; pilocarpina clorhidrato; pirarubicina; piritrexim; placetin A; placetin B; inhibidor del activador de plasminógenos; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero de sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandin J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmunológico basado en proteína A; inhibidor de la quinasa de proteína C; inhibidores de la quinasa de proteína, microalgal; inhibidores de fosfatasa de proteína tirosina; inhibidores de la fosforilasa de

nucleósido de purina; purpurins; pirazoloacridina; conjugado piridoxilado de hemoglobina polioxietileno; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores de la ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; retelliptina desmetilada; renio Re 186 etidronato; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopin; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; Sdi 1 mimetics; semustina; inhibidor derivado de senescence 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de transducción de señal; moduladores de transducción de señal; proteína de unión al antígeno de cadena simple; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sodio; felacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermin; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; esqualamina; inhibidor de mastocitos; inhibidores de la división de mastocitos; estipiamida; inhibidores estromelisina; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; tamoxifeno metiodida; tauromustina; tazaroteno; tecogalan de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; teniposida; tetraclorodecaoxida; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoietina; imigador de trombopoietina; timalfasin; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante de tiroides; etiopurpurina de estaño etilo; tirapazamina; titanoceno biclorida; topsentin; toremifeno; factor de mastocitos totipotente; inhibidores de translación; tretinoin; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelin; tropisetron; turosterida; inhibidores de quinasa de la tirosina; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema vector, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdins; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalámero. Los fármacos adicionales preferidos contra el cáncer 5-fluorouracilo y Leucovorina.

[00366] Algunos ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en los métodos de la invención incluyen aunque no se limitan a ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un inmunosupresor, anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado para la prevención del rechazo al aloinjerto renal agudo; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a del antígeno de superficie celular de murino anti-17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo anti-idiotipo murino (epítope GD3) de IgG (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo quimérico anti-EGFR de IgG (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo humanizado de integrina anti-αVβ3 (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo humanizado anti-CD33 de IgG (Proteína Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo humanizado anti-CD22 de IgG (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo de rimate anti-CD80 (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo humanizdo anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo de

primate anti-CD4 (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo de primate anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG humanizada anti-CD3 (Proteína Design Lab); 5G1,1 es un anticuerpo humanizado del factor 5 anti complemento (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF-α (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab humanizado anti-TNF-α (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo de primate anti-CD4 IgG1 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo humano anti-CD4 IgG (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo humanizado anti-TNF-α IgG4 (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti-α4β7 (LeukoSite/Genentech); othoClone OKT4A es un anticuerpo humanizado anti-CD4 IgG (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo humanizado anti-CD40L IgG (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo humanizado anti-VLA-4 IgG (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo humano anti-TGF-β_2 (Cambridge Ab Tech). Algunos otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse de acuerdo con la invención se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: **Anticuerpos terapéuticos contra el cáncer**

Empresa	**Producto**	**Enfermedad**	**Blanco**
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	Receptor de EGF
AltaRex	OvaRex	cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	cánceres metastáticos	antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pemtumomabytrrium-90)	cáncer de ovario	Antígeno PEM
	Therex	cáncer de mama	Antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	Blvatuzumab	cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	Cáncer colo rectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	ACV isquémico	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAb, 105AD7 idiotípico	vacuna para el cáncer colo rectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	MAb, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón de células no pequeñas	NA
Genentech	Herceptin	cáncer de mama metastático	HER-2
	Herceptin	cáncer de mama en etapa inicial	HER-2
	Rituxan	NHL folicular o de bajo grado con recaída/refractario	CD20
	Rituxan	HNL intermedio y de alto grado	CD20
	MAb-VEGF	NSCLC, metastático	VEGF
	MAb-VEGF	Cáncer colo rectal, metastático	VEGF
	AMD Fab	degeneración macular relacionada con la edad	CD18

Empresa	Producto	Enfermedad	Blanco
	E-26 (2da gen. IgE)	asma alérgica y rinitis	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + yttrium-90)	NHL refractario a RItuximab y NHL de células B, CD20 positivo, refractario o con recaída, de bajo grado folicular	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecan	carcinoma colo-rectal refractario	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino & radiación	cáncer de cabeza y cuellorecientemente diagnosticado o recurrente	Receptor de EGF
	Cetuximab + gemcitabina	carcinoma de páncreas recientemente diagnosticado metastático	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastático	Receptor de EGF
	Cetuximab + carboplatin + paclitaxel	carcinoma de pulmón de células no pequeñas recientemente diagnosticado	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza y cuello (enfermedad y metástasis distante regional-local incurable extensiva)	Receptor de EGF
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza y cuello avanzado en forma local	Receptor de EGF
	BEC2 + Bacillus Calmette Guerin	carcinoma de pulmón de células pequeñas	mimics ganglioside GD3
	BEC2 + Bacillus Calmette Guerin	melanoma	mimics ganglioside GD3
	IMC-1C11	cáncer colo rectal con metástasis hepática	VEGF-receptor
ImmonoGen	nuC242-DM1	Colorectal, gastric, y pancreatic cáncer	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	Linfoma no de Hodgkins	CD22
	LymphoCide Y-90	Linfoma no de Hodgkins	CD22
	CEA-Cide	tumores metastáticos sólidos	CEA
	CEA-Cide Y-90	tumores metastáticos sólidos	CEA

Empresa	Producto	Enfermedad	Blanco
	CEA-Scan (Arcitumomab rotulado Tc-99m)	cáncer colo rectal (radioimaging)	CEA
	CEA-Scan (Arcitumomab rotulado Tc-99m)	Cáncer de mama (radioimágen)	CEA
	CEA-Scan (Arcitumomab rotulado Tc-99m)	cáncer de pulmón (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (Arcitumomab rotulado Tc-99m)	tumores intraoperativos (radio imagen)	CEA
	LeukoScan (Tc-99m-labeled sulesomab)	soft tissue infection (radio imagen)	CEA
	LymphoScan (Tc-99m-labeled)	linfomas (radio imagen)	CD22
	AFP-Scan (Tc-99m-labeled)	cáncer de células cebada 7 de hígado (radio imagen)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ yttrium-90)	cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	imagen colo rectal	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	Próstata y otros cánceres	CTLA-4
	MDX-210 (sobre-expresión her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxin	Cáncer	$\alpha v\beta_3$
Merck KGaA	MAb 425	Varios cánceres	Receptor de EGF
	IS-IL-2	Varios cánceres	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-streptavidin (+ biotin-yttrium 90)	Linfoma no de Hodgkins	CD20
	Avidicin (albúmina + NRLU13)	cáncer metastático	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	Linfoma no de Hodgkins	HLA-DR 10 beta
	Cotara (+ yodo-131)	glioma maligno no extirpable	Proteínas asociadas con ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ staphylococcal enterotoxin)	cáncer de páncreas	NA
	MAb, cáncer de pulmón/rión	cáncer de pulmón y riñón	NA
	nacolomab tafenatox (C242 + enterotoxina de estafilococo)	colon & cáncer de páncreas	NA
Proteína Design Labs	Nuvion	Enfermedades de células T	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	Antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	cáncer colo rectal, avanzado	CEA
	TriGem	cáncer de pulmón de células pequeñas y melanoma metastático	GD2-gangliosida
	TriAb	cáncer metastático de mama	MUC-1

Empresa	Producto	Enfermedad	Blanco
Trilex	CEAVac	cáncer colo rectal, avanzado	CEA
	TriGem	cáncer de pulmón de células pequeñas y melanoma metastático	GD2-gangliosida
	TriAb	cáncer metastático de mama	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 radiomarcado	Linfoma no de Hodgkins	NA
	Monopharm C	colorectal & pancreatic carcinoma	SK-1 antigen
	GlioMAb-H (+ toxina gelonina)	gliorna, melanoma & neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan	NHL folicular o de bajo grado con recaída/refractario	CD20
	Rituxan	HNL intermedio y de alto grado	CD20
	ING-1	adenomcarcinoma	Ep-CAM

5.5.6 AGENTES MODULADORES INMUNOLÓGICOS Y AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

[00367] La presente invención proporciona métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que comprende administration de las moléculas de la invención en conjunción con otros agentes de tratamiento. Algunos ejemplos de agentes moduladores inmunológicos incluyen, aunque no se limitan a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, y antibióticos macrólidos (*por ej.*, FK506 (tacrolimo)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteriodes, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimo), mizoribina, desoxispergualina, brequinar, malononitriloamindes (*por ej.*, leflunamida), moduladores del receptor de células T, y moduladores del receptor de citoquina.

[00368] Los agentes antiinflamatorios han exhibido éxito en el tratamiento de trastornos autoinmunes e inflamatorios y actualmente son un tratamiento estándar y común para dichos trastornos. Cualquier agente anti-inflamatorio conocido para una persona con experiencia en la materia puede ser utilizado en los métodos de la invención. Algunos ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroides, beta-agonistas, agentes anticolinérgicos, y metil xantinas. Algunos ejemplos de AINE incluyen, aunque no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozin (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentin (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxen (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan mediante la inhibición

de una enzima ciclooxgenasa (*por ej.*, COX-1 y/o COX-2). Algunos ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroides incluyen, aunque no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina, y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos.

[00369] Un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios en conjunción con las moléculas de la invención se presenta en la Tabla **9**, y un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastorno autoinmune se presenta en la **Tabla 10**.

Table 9: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento of enfermedades inflamatorias

Nombre del anticuerpo	Antígeno de destino	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinantes	Indicación
5G1,1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1,1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1,1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1,1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Bypass cardiopulmonar
5G1,1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1,1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo al aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Rechazo al aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo al aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rat	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectin	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Fact VII	Chimeric		Centocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	ACV

Nombre del anticuerpo	Antígeno de destino	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinantes	Indicación
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Shock tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/GlaxoSmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/ Alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Crohn’s
LDP-01	beta2-integrin	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	ACV
LDP-01	beta2-integrin	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo al aloinjerto
LDP-02	alfa 4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerativa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab’2	Knoll Pharm, BASF	Shock tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centeon	Trastornos hematológicos autoinmunes disorders
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo al aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmune
Orthoclone / anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo al aloinjerto
RepPro/ Abciximab	gpIIbIIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de la angioplastía coronaria angioplastia
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	Asma/ Alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/ Alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKli	Asma/

Nombre del anticuerpo	Antígeno de destino	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinantes	Indicación
				ne	Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Scheri ng	Asma/ Alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo al aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Proteína Design Lab	Enfermedad autoinmune
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Proteína Design Lab	Rechazo al aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Proteína Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Proteína Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo al aloinjerto

Tabla 10: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento of trastornos autoinmunes

Anticuerpo	Indicación	Antígeno de destino
ABX-RB2		anticuerpo para el antígeno CBL en células T, células B y células NK anticuerpo totalmente humano del Xenomouse
5c8 (Anti CD-40 un antígeno anticuerpo)	Los ensayos de Fase II se interrumpieron en Oct. 99 examinar “eventos adversos”	CD-40
IDEC 131	lupus eritematoso sistémico (SLE)	anti CD40 humanizado
IDEC 151	artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
IDEC 152	Asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	primatizado anti-CD80
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple Enfermedad de Crohn Psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (anti-b7 mAb)	enfermedad inflamatoria intestinal Enfermedad de Crohn colitis ulcerativa	receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
SMART Anti-Gamma Interferón anticuerpo	trastornos autoinmunes	Interferón anti-gamma
Verteportin	artritis reumatoide	
MDX-33	trastornos de la sangre causados por reacciones autoinmunes Trombocitopenia idiopática Purpurea (ITP) anemia hemolítica autoinmune	anticuerpo monoclonal contra Receptores FcRI
MDX-CD4	tratar artritis reumatoide y otra autoinmunidad	anticuerpo monoclonal contra la molécula del receptor CD4
VX-497	trastornos autoinmunes esclerosis múltiple	inhibidor de monofosfato deshidrogenasa

Anticuerpo	Indicación	Antígeno de destino
	artritis reumatoide enfermedad inflamatoria intestinal lupus psoriasis	(enzima necesaria para hacer nuevo ARN y ADN usada en la producción de nucleótidos necesarios para proliferación de linfocitos)
VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de ICE interleucina-1 beta (enzima conversora controla vías que conducen a la respuesta inmunológica agresiva)
VX-745	específico para la inflamación involucrada en la señalización química del comienzo de la respuesta inmunológicaonset y progresión de la inflamación	inhibidor de P38MAP quinasa quinasa de la proteína activada por mitógeno
Enbrel (etanercept)		TNF objetivos (factor de necrosis tumoral)
IL-8		anticuerpo totalmente humano monoclonal contra IL-8 (interleukin 8)
Apogen MP4		antígeno recombinante destruye selectivamente las células T asociadas con enfermedades induce apoptosis Células T eliminadas por muerte celular programada ya no ataca las células del propio cuerpo los apógenos específicos orientan a células T específicas

5.5.7 AGENTES PARA USAR EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD INFECCIOSA

[00370] En algunas realizaciones, las moléculas de la invención puede administrarse en combinación con una cantidad efectiva para terapia o profilaxis de uno o varios agentes terapéuticos conocidos por aquellos expertos en la materia para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa. La invención contempla el uso de las moléculas de la invención en combinación con antibióticos conocidos por aquellos expertos en la materia para el tratamiento y/ o prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, aunque no se limitan a, macrólida (*por ej.*, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (*por ej.*, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozil (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxil (Duricef®)), una clarihromicina (*por ej.*, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (*por ej.*, eritromicina (EMicina®)), una penicilina (*por ej.*, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (*por ej.*, ofloxacina (Floxin®), ciprofloxacina (Cipro®) o norfloxacina (Noroxin®)), antibióticos de aminoglicósidos (*por ej.*,

apramicina, arbekacin, bambermicinas, butirosin, dibekacin, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicin, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, y espectinomicina), antibiótico de anfenicol (*por ej*., azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol, y tiamfenicol), antibióticos de ansamicina (*por ej*., rifamida y rifampina), carbacefemos (*por ej*., loracarbef), carbapenems (*por ej*., biapenem e imipenem), cefalosporinas (*por ej*., cefaclor, cefadroxil, cefamandole, cefatrizine, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida, y cefpiroma), cefamicinas (*por ej*., cefbuperazona, cefmetazol, y cefminox), monobactamas (*por ej*., aztreonam, carumonam, y tigemonam), oxacefems (*por ej*., flomoxef, y moxalactam), penicilinas (*por ej*., amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina de sodio, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamccilina, penetamato yodhidrato, penicilina o-benetamina, penicilina 0, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina, y fencihicilina de potasio), lincosamidas (*por ej*., clindamicina, y lincomicina), amfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclinas (*por ej*., apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (*por ej*., brodimoprim), nitrofuranos (*por ej*., furaltadone, y cloruro de furazolio), quinolonas y sus análogos (*por ej*., cinoxacina, clinafloxacina, flumequina, y grepagloxacina), sulfonamidas (*por ej*., acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina, y sulfacitina), sulfonas (*por ej*., diatimosulfona, glucosulfona de sodio, y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

[00371] En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad efectiva para terapia o profilaxis de una o más agentes antifúngicos. Los agentes antifúngicos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen aunque no se limitan a anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatin, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrin, naftifina, terbinafina, undecilenato, y griseofuldina.

[00372] En algunas realizaciones, las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad efectiva para terapia o profilaxis de uno o más agente anti-viral. Los agentes antivirales útiles que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, aunque no se limitan a, inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósido, inhibidores de transcriptasa inveresa no nucleóxidos y análogos de nucleósidos. Algunos ejemplos de agentes antivirales incluyen aunque no se limitan a zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridine, trifluridina, y ribavirina, así como también foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los alfa -interferones; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.6 TERAPIA DE VACUNACIÓN

[00373] La invención abarca, además, con el uso de una composición de la invención para inducir una respuesta inmunológica contra un agente antigénico o agente inmunogénico, que incluyen aunque sin limitarse un antígenos del cáncer y antígenos de una enfermedad infecciosa (algunos ejemplos de los cuales se divulgan más abajo). Las composiciones de las vacunas de la invención comprenden one o más agentes antigénicos o inmunogénicos para los cuales se desea una respuesta inmunológica, en donde el o los agentes antigénicos o inmunogénicos se recubre con un anticuerpo variante de la invención que tiene una potenciada afinidad por FcγRIIIA. Las composiciones de las vacunas de la invención son particularente efectivas en generar una respuesta inmunol´gica, con preferencia una respuesta inmunológica contra el agente antigénico inmunogénico.

[00374] En algunas realizaciones, the agente antigénico inmunogénico en las composiciones de las vacunas de la invención comprende un virus contra el cual se desea una respuesta inmunológica. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos y con preferencia están atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede realizarse con el uso de métodos estándar conocidos por los expertos en el arte. La invención abarca una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada que se formulará de acuerdo con la invención. Puede preferirse una vacuna viva debido a que la multiplicación en el huésped conduce a un estímulo prolongado de clase similar y magnitud que el que ocurre en las infecciones naturales, y por lo tanto, confiere inmunidad duradera, sustancial. La producción de dichas formulaciones de vacuna de virus recombinante vivo puede lograrse con el uso de métodos convencionales que incluyen la propagación del virus en el cultivo celular o en el alantoide de embriones de pollo eguido de purificación.

[00375] En una realización específica, el virus recombinante es no patogénico para el sujeto a quien se administra. En este aspecto, el uso virus diseñados genéticamente para fines de vacunación puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (*por ej.*, eliminaciones) en los patrones usados para transfección pueden proveer a los novedosos virus las características de atenuación. Por ejemplo, las mutaciones específicas de sentido equivocado que están asociadas con sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío pueden convertiré en mutaciones por eliminación. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles al frío y la temperatura y las frecuencias de revisión deben ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinantes para diseñar virus recombinantes se conocen en la materia y se abarcan en la invención. Por ejemplo, las técnicas para modificar virus de ARN de hebra negativa se conocen en la materia, véase, *por ej.*, Patente de los EE UU Nro. 5,166,057, que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00376] En forma alternativa, los virus quiméricos con características “suicidas” pueden construirse para usar en las formulaciones de vacunas transdérmicas de la invención. Dichos

virus atravesarían sólo uno o algunos ciclos de replicación dentro del huésped. Cuando se usa como vacuna, el virus recombinante sufriría limitado(s) ciclo(s) de recplicación e induciría un nivel suficiente de respuesta inmune pero avanzaría además en el huésped humano y causaría enfermedad. En forma alternativa, el virus inactivado (muerto) puede formularse de acuerdo con la invención. Las formulaciones de vacunas inactivadas pueden prepararse con el uso de técnicas convencionales para “matar” los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están “muertas” en el sentido que su capacidad de infección se ha destruido. En forma ideal, la capacidad de infección del virus se destruye sin afectar su inmunogenicidad. Con el fin de preparar las vacunas inactivadas, el virus quimérico puede cultivarse en cultivo celular o en el alantoide del embrión de pollo, purificado por ultracentrifugado zonal, inactivado por formaldehído o β-propiolactona, y agrupado.

[00377] En ciertas realizaciones, epítopes completamente extraños, que incluyen antígenos derivados de otros patógenos no virales o virales pueden diseñarse en el virus para usar en las formulaciones de vacunas transdérmicas de la invención. Por ejemplo, los antígenos de virus no relacionados tales como antígenos de parásitos del VIH (gp160, gp120, gp41) (*por ej.*, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales pueden diseñarse en la cepa atenuada.

[00378] Virtualmente cualquier secuencia génica heteróloga puede construirse en los virus quiméricos de la invención para usar en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Con preferencia, las secuencias génicas heterólogas son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Con preferencia, los epítopes que inducen una respuesta inmunológica protectora a cualquiera de una variedad de patógenos, o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes pueden ser expresados por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden construirse en los virus quiméricos de la invención incluyen, aunque no se limitan a, heuraminidasa de hemaglutinina de gripe y pseudogripe y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F de PIV3 humano. Incluso en otra realización, las secuencias génicas heterólogas que pueden diseñarse en los virus quiméricos incluyen aquellas que codifican proteínas con actividades inmuno moduladoras. Algunos ejemplos de proteínas inmuno moduladoras incluyen, aunque no se limitan a, citoquinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12, y antagonistas de estos agentes.

[00379] Incluso, en otras realizaciones, la invención abarca células o virus patogénicos, con preferencia virus atenuado, que expresan el anticuerpo variante sobre su superficie.

[00380] En realizaciones alternativas, las composiciones de las vacunas de la invención comprenden un polipéptido de fusión en donde un agente antigénico o inmunogénico está ligado en forma operativa a un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad potenciada por FcγRIIIA. El diseño de los polipéptidos de fusión para usar en las

composiciones de las vacunas de la invención se realiza con el uso de métodos de rutina de tecnología de ADN recombinante está dentro del nivel de habilidad común.

[00381] La invención abarca, además, métodos para inducir tolerancia en un sujeto por la administración de una composición de la invención. Con preferencia una composición apropiada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante de la invención, en donde el anticuerpo variante tiene mayor afinidad por FcγRIIB. Aunque sin intención de ligarse a un mecanismo de acción particular, dichas composiciones son efectivas en la inducción de tolerancia por la activación de la vía inhibidora mediada por FcγRIIB.

5.7 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

[00382] La invención proporciona métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de la invención (*es decir*, diacuerpos) que comprende múltiples dominios de unión al epítope y, en forma opcional, un dominio Fc (o porción de los anteriores). La invención también proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y alivio de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección por la administración de a un sujeto una cantidad efectiva de una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención. En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión, o una molécula conjugada, es en forma sustancial purificada (*es decir*, en forma sustancial libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos colaterales no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, con preferencia un mamífero tales como no primate (*por ej.*, vacas, cerdos caballos perros, ratas *etc.*) y un primate (*por ej.*, mono tales como, un mono macaco y un humano). En una realización preferida, el sujeto es un humano. Incluso en otra realización preferida, el anticuerpo de la invención es de la misma especie que el sujeto.

[00383] Varios sistemas de administración se conocen y pueden usarse para administrar una composición que comprende moléculas de la invención, *por ej.*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por el receptor (Véase, *por ej.*, Wu *et al.* (1987) *"Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,"* J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, *etc.* Los métodos de administración de una molécula de la invención incluyen, aunque no se limitan a, administración parenteral (*por ej.*, intradérmica, intramuscular, intraperitoneana, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosa (*por ej.*, vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de la invención se administran por vía intramuscular, vía intravenosa, o vía subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (*por ej.*, mucosa oral,

rectal y mucosa intestinal, *etc*.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistéimica o local. Además, también puede emplearse administración pulmonar, *por ej*., por medio del uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente vaporizador. Véase, *por ej*., Patentes de EE UU Nros. 6,019,968; 5,985, 320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones por PCT Nros. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00384] La invención también proporciona que las moléculas de la invención se envasen en un recipìente sellado herméticamente tales como una ampolla o sachét que indica la cantidad de anticuerpo. En una realización, las moléculas de la invención se suministran como un polvo esterilizado liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipìente sellado herméticamente y puede reconstituirse, *por ej*., con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para administración a un sujeto. Con preferencia, las moléculas de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril anhidro en un recipìente sellado herméticamente en una unidad de dosificación de por lo menos 5 mg, con mayor preferencia por lo menos 10 mg, por lo menos 15 mg, por lo menos 25 mg, por lo menos 35 mg, por lo menos 45 mg, por lo menos 50 mg, o por lo menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la invención deben almacenarse a entre 2 y 8°C en su envase original y las moléculas deben administrarse dentro de 12 horas, con preferencia dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de haberse reconstituido. En una realización alternativa, las moléculas de la invención se suministran en forma líquida en un recipìente sellado herméticamente lo que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión, o molécula conjugada. Con preferencia, la forma líquida de las moléculas de la invención se suministra en un recipìente sellado herméticamente por lo menos 1 mg/ml, con mayor preferencia por lo menos 2,5 mg/ml, por lo menos 5 mg/ml, por lo menos 8 mg/ml, por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 15 mg/kg, por lo menos 25 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, por lo menos 100 mg/ml, por lo menos 150 mg/ml, por lo menos 200 mg/ml de las moléculas.

[00385] La cantidad de la composición de la invención que será efectiva en el tratamiento, prevención o alivio de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse por técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la seriedad de la afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del practicante y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de análisis de modelos in vitro o animales.

[00386] Para los diacuerpos abarcados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es normalmente 0,0001 mg/kg hasta 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Con preferencia, la dosificación administrada a un paciente es entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg,

0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg hasta 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación y frecuencia de administración de los diacuerpos de la invención puede reducirse o alterarse potenciando la captación y penetración al tejido de los diacuerpos por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

[00387] En una realización, la dosificación de las moléculas de la invención administrada a un paciente puede ser desde 0,01 mg hasta 1000 mg/día cuando se usa como terapia con agente simple. En otra realización las moléculas de la invención se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente son menores que cuando dicha moléculas se usan como terapia con un agente único.

[00388] En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención en forma local al área que necesita de tratamiento; esto puede lograrse por, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, por inyeccón, o por medio de un implante, dicho implante es un material gelatinoso no poroso o poroso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Con preferencia, cuando se administra una molécula de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales a los cuales la molécula no se absorba.

[00389] En otra realización, las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Véase Langer (1990) *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cáncer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327; véase en general ibid.).

[00390] Incluso en otra realización, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación prolongada. Cualquier técnica conocida para una persona con experiencia en la materia puede usarse para producir formulaciones de liberación prolongada que comprenden una o más moléculas de la invención. *Véase, por ej.*, Patente de los EE UU Nro. 4,526,938; Publicación por PCT WO 91/05548; Publicación por PCT WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"* Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam *et al.* (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad. En una realización,

puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (Véase Langer, *supra*; Sefton, (1987) "*Implantable Pumps,*" CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) "*Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis,*" Cirugía 88:507-516; y Saudek *et al.* (1989) *"A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery,"* N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de los anticuerpos (*véase por ej*., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Diseño y Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy *et al.* (1985) *"Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosponate,"* Science 228:190-192; During *et al.* (1989) "*Controlled Release Of Dopamine From A Polimeric Brain Implant: In Vivo Caracterization,"* Ann. Neurol. 25:351-356; Howard *et al.* (1989) "*Intracerebral Drug Delivery In Ratas With Lesion-Induced Memory Deficits,"* J. Neurosurg. 7(1):105-112); Patente de los EE UU Nro. 5,679,377; Patente de los EE UU Nro. 5,916,597; Patente de los EE UU Nro. 5,912,015; Patente de los EE UU Nro. 5,989,463; Patente de los EE UU Nro. 5,128,326; Publicación por PCT Nro. WO 99/15154; y Publicación por PCT Nro. WO 99/20253). Algunos ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación prolongada incluyen, aunque no se limitan a, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(co-vinil acetato de etileno), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(vinyl alcohol), poliacrilamida, poli(etilene glicol), polilácticos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. Incluso en otra realización, un sistema de liberación controlada puede ubicarse en proximidad del agente terapéutico (*por ej*., los pulmones), de este modo sólo se requiere una fracción de la dosis sistémica (véase, *por ej*., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). En otra realización, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan de acuerdo con Dunn *et al.* (Véase U.S. 5,945,155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación puede ocurrir en general en cualquier parte dentro del cuerpo del paciente que necesita de tratamiento terapéutico. En otra realización, se usa un sistema de administración prolongada no polimérica, por el cual un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto se usa como sistema de administración de medicamento. Luego del implante en el cuerpo, el solvente orgánico del implante se disipará, dispersará o filtrará de la composición en el líquido del tejido circundante, y el material no polimérico se coagulará gradualmente o precipitará para formar una matriz microporosa sólida (Véase U.S. 5,888,533).

[00391] Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión realizada por Langer (1990, *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida para una persona con experiencia en la materia puede usarse para producir formulaciones de liberación prolongada que comprende uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, *por ej.*, Patente de los EE UU Nro. 4,526,938; Publicaciones Internacionales Nros. WO 91/05548 and WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"* Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) *"Biodegradable Polimeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam *et al.* (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada una de las cuales se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00392] En una realización específica donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo de la invención, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su diacuerpo codificado, al construirlo como parte de un vector apropiado de expresión del ácido nucleico y administrarlo de modo tal que se torne intracelular, *por ej.*, por el uso de un vector retroviral (Véase Patente de los EE UU Nro. 4,980,286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo de micropartículas (*por ej.*, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o genes de transfección, o por la administración de éste junto con un péptido símil homeobox que se conoce por ingresar al núcleo (Véase por ej., Joliot *et al.* (1991) *"Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), *etc.* En forma alternativa, un ácido nucleico puede introducirse en forma intracelular e incorporarse dentro de ADN de célula huésped para expresión por recombinación homóloga.

[00393] El tratamiento de un sujeto con una cantidad efectiva para terapia o profilaxis de moléculas de la invención puede incluir un tratamiento simple o, con preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con moléculas de la invención en el rango de entre alrededor de 0,1 a 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre alrededor de 1 a 10 semanas, con preferencia entre 2 a 8 semanas, con mayor preferencia entre alrededor de 3 a 7 semanas, y incluso con mayor preferencia durante alrededor de 4, 5, o 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran una vez por día, dos veces por día, o tres veces por día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez por semana, dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez por mes, una vez cada seis semanas, una vez

cada dos meses, dos veces por año o una vez por año. Se apreciará además que la dosificación efectiva de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentar o reducirse con el transcurso de un tratamiento particular.

5.7.1 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[00394] Las composiciones de la invención incluyen composiciones de medicamentos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (*por ej*., composiciones no estériles o impuras) y composiciones farmacéuticas (*es decir*, composiciones que son apropiadas para administración a un sujeto o paciene) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un agente profiláctico y/o terapéutico divulgado en este documento o una combinación de esos agentes y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Con preferencia, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de una o más moléculas de la invención y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00395] La invención abarca, además, composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula del diacuerpo de la invención y un anticuerpo treapéutico (*por ej*., anticuerpo monoclonal específico del tumor) that es específico para a particular cáncer antigen, y a pharmaceutically acceptable carrier.

[00396] En una realización específica, el término “aceptables desde el punto de vista farmacéutico” significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de los EE UU u otra farmacopea generalmente reconocida para usar en animales, y más particularmente en humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante (*por ej.*, adyuvante de Freund (completo o incompleto), excipiente o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es el vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse solucioes salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos apropiados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulacines de liberación prolongada y similares.

[00397] En general, los ingedientes de las composiciones de la invención se suministran ya sea separados o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo

liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipìente sellado herméticamente tales como una ampolla o sachét que indica la cantidad de principio activo. Donde la composición pretende administrarse por infusión, puede dispensarse con un frasco para infusión que contiene agua estéril grado farmacéutico o solución salina. Donde la composición se administra por inyeccón, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de modo tal que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

[00398] Las composiciones de la invención pueden formularse como formas de sales o neutras. Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen, aunque no se limitan a, aquellas formadas con aniones tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, *etc.*, y aquellas formadas con cationes tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calbio, hidróxidos de hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, *etc.*

5.7.2 TERAPIA GÉNICA

[00399] En una realización específica, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican las moléculas de la invención se administran para tratar, prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o infección, por medio de terapia génica. Terapia génica se refiere una terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o susceptible de expresarse. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o proteína de fusión que media un efecto terapéutico o profiláctico.

[00400] Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la materia puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos ejemplificativos se describen a continuación.

[00401] Para obtener revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel *et al.* (1993) *"Human Gene Therapy,"* Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu *et al.* (1991) *"Delivery Systems For Gene Therapy,"* Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993*) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions,"* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) *"The Basic Science Of Gene Therapy,"* Science 260:926-932; y Morgan *et al.* (1993) *"Human Gene Therapy,"* Ann. Rev. Biochem. 62:191-217. Los métodos comúnmente conocidos en la materia de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

[00402] En un aspecto preferido, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican un diacuerpo de la invención, dichos ácidos nucleicos son parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped apropiado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, con preferencia promotores heterólogos, ligados en forma operativa a la región de codificación del anticuerpo, dicho promotor es inducible o

constitutivo, y, en forma opcional, específico del tejido. En otra realización particular, se usan las moléculas de ácido nucleico en las cuales la secuencia de codificación del anticuerpos y cualquier otra secuencia deseada están rodeadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en el sitio deseado del genoma, suministrando de este modo la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller *et al.* (1989) *"Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra *et al.* (1989) *"Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells,"* Nature 342:435-438).

[00403] En otro aspecto preferido, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, dichos ácidos nucleicos son parte de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un huésped apropiado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, con preferencia promotores heterólogos, ligada en forma operativa a la región de codificación de una proteína de fusión, dicho promotor es inducible o constitutivo, y en forma opcional, específico del tejido. En otra realización particular, las moléculas de ácido nucleico se usan en la cual la secuencia de codificación de la proteína de fusión y cualquier otra secuencia deseada están rodeadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en el sitio deseado del genoma, suministrando de este modo la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

[00404] La administración de los ácidos nucleicos en un sujeto puede ser indistintamente directa, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o vectores que transportan ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, primero se transforman las células con los ácidos nucleicos in vitro, luego se transplantan en el sujeto. Estos dos métodos se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

[00405] En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el producto codificado. Esto puede lograrse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la materia, *por ej.*, by al construirlos como parte de un vector apropiado de expresión del ácido nucleico y administrarlo de modo tal que se torne intracelular, *por ej.*, por infección con el uso de vectores defectuosos o retrovirales atenuados u otros vectores virales (Véase Patente de los EE UU Nro. 4,980,286), o por inyección directa de ADN purificado, o por el uso de bombardeo de micropartículas (*por ej.*, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o genes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o por la administración de los mismos en relación a un péptido que se conoce por ingresar al núcleo, por la administración del mismo con relación a un antígeno sujeto a endocitosis mediada por el receptor (Véase, *por ej.*, Wu et al. (1987) *"Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,"* J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que pueden usarse para dirigir Tipo de Células que

específicamente expresan los receptores), *etc*. En otra realización, los complejos de ácido nucleico pueden formarse en los cuales el antígeno comprende un péptido viral fusogénico para interrumpir los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. Incluso en otra realización, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para captación y expresión específica de las células, orientando un receptor específico (Véase, *por ej.*, Publicaciones por PCT WO 92/06180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188; WO 93/20221). En forma alternativa, el ácido nucleico puede introducirse en forma intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para expresión, por recombinación homóloga (Koller *et al.* (1989) *"Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination,"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra *et al.* (1989) *"Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells,"* Nature 342:435-438).

[00406] En una realización específica, se usan los vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de la invención (*por ej.*, un diacuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, un vector retroviral puede usarse (Véase Miller *et al.* (1993) *"Use Of Retroviral Vectors For Gene Transfer And Expression,"* Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto envasado del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. La secuencia de ácido nucleicos que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se usará en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración de la secuencia de nucleótidos en un sujeto. Mas detalles sobre los vectores retrovirales pueden encontrarse en Boesen *et al.* (1993) *"Circumvention Of Quimioterapia-Induced Myelosuppression By Transfer Of The Mdr1 Gene,"* Biotherapy 6:291-302), que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen mdr 1 a mastocitos hematopoyéticos con el fin de hacer que los mastocitos sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes *et al.* (1994) *"Long-Term Biological Response Of Injured Rat Carotid Artery Seeded With Smooth Muscle Cells Expressing Retrovirally Introduced Human Genes,"* J. Clin. Invest. 93:644-651; Keim *et al.* (1994) *"Retrovirus-Mediated Gene Transduction Into Canine Peripheral Blood Repopulating Cells,"* Blood 83:1467-1473; Salmons *et al.* (1993) *"Targeting Of Retroviral Vectors For Gene Therapy,"* Human Gene Therapy 4:129-141; y Grossman *et al.* (1993) *"Retroviruses: Delivery Vehicle To The Liver,"* Curr. Opin. Genetics and Devel. 3:110-114.

[00407] Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenoviruses son vehículos especialmente atractivos para administrar genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan naturalmente los epitelios respiratorios donde causan una enfermedad leve. Otros blancos para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculos. Los

adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar de células no divisorias. Kozarsky *et al.* (1993, *"Gene Therapy: Adenovirus Vectors,"* Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503) presenta una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.* (1994, *"Lung Gene Therapy: In Vivo Adenovirus-Mediated Gene Transfer To Rhesus Monkey Airway Epithelium,"* Human Gene Therapy, 5:3-10) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otras instancias del término uso de adenoviruses en terapia génica puede encontrarse en Rosenfeld *et al.* (1991) *"Adenovirus-Mediated Transfer Of A Recombinant Alfa 1-Antitrypsin Gene To The Lung Epithelium In Vivo,"* Science 252:431-434; Rosenfeld *et al.* (1992) *"In Vivo Transfer Of The Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene To The Airway Epithelium,"* Cell 68:143-155; Mastrangeli *et al.* (1993) *"Diversity Of Airway Epithelial Cell Targets For In Vivo Recombinant Adenovirus-Mediated Gene Transfer,"* J. Clin. Invest. 91:225-234; Publicación por PCTW094/12649; y Wang *et al.* (1995) *"A Packaging Cell Line For Propagation Of Recombinant Adenovirus Vectors Containing Dos Lethal Gene-Region Deletions,"* Gene Therapy 2:775-783. En una realización preferida, se usan vectores de adenovirus.

[00408] El virus adeno asociado (AAV) también se ha propuesto para usar en terapia génica (véase, *por ej*., Walsh *et al.* (1993) *"Gene Therapy For Human Hemoglobinopathies,"* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 y Patente de los EE UU Nro. 5,436,146).

[00409] Otro enfoque para la terapia génica incluye transferir un gen a las células en el cultivo de tejido por dichos métodos as electroporación, lipofection, calcium phosphate mediated transfection, o viral infection. Usualmente, el método of transfer incluye the transfer of un marcador seleccionable a las células. The cells are then placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells are then delivered a un sujeto.

[00410] En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la materia, que incluyen aunque sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriofago, que contiene la secuencia de ácido nucleicos, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplatos, *etc*. Numerosas técnicas se conocen en la materia para la introducción de genes extranjeros en las células (Véase, *por ej.*, Loeffler *et al.* (1993) *"Gene Transfer Into Primary And Established Mammalian Cell Lines Con Lipopolyamine-Coated DNA,"* Meth. Enzymol. 217:599-618, Cotten *et al.* (1993) *"Receptor-Mediated Transport Of DNA Into Eukariotic Cells,"* Meth. Enzymol. 217:618-644) y pueden usarse de acuerdo con la presente invención, siempre que no se interrumpan las funciones fisiológicas y de desearrollo necesarias de la células receptoras. La técnica demostraría la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de

modo tal que el ácido nucleico es susceptible de expresarse en la célula y con preferencia capaz de heredarse y expresarse por su progenie celular.

[00411] Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto por varios métodos conocidos en la materia. Las células sanguíneas recombinantes (*por ej*., células progenitoras o cebada hematopoyéticas) con preferencia se administran por vía intravenosa. La cantidad de células contempladas para usar depende del efecto deseado, el estado del paciente, *etc*., y puede ser determinada por una persona con experiencia en la materia.

[00412] Las células en las cuales un ácido nucleico puede introducirse para los fines terapia génica abarcan cualquier tipo de célula apropiada disponible, e incluyen aunque no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células de la sangre tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varias células cebada o progenitoras, en particular células cebada o progenitoras hematopoyéticas, *por ej*., obtenidas de la médula ósea, de la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, *etc*.

[00413] En una realización preferida, la célula usada para terapia génica es autóloga al sujeto.

[00414] En una realización en la cual las células recombinantes se usan en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión se introducen en las células de manera tal que sean susceptibles de ser expresadas por las células o su progenie, y las células recombinantes luego se administra *in vivo* para lograr el efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células progenitoras o cebada. Cualquier céllula cebada y/o progenitora que puede aislarse y mantenerse *in vitro* puede usarse potencialmente de acuerdo con esta realización de la presente invención (*Véase por ej*., Publicación por PCTWO 94/08598; Stemple *et al.* (1992) *"Isolating A Stem Cell For Neurons And Glia From The Mammalian Neural Crest,"* Cell 7 1:973-985; Rheinwald (1980) *"Serial Cultivation Of Normal Human Epidermal Keratinocytes,"* Meth. Cell Bio. 21A:229-254; y Pittelkow *et al.* (1986) *"New Techniques For The In Vitro Culture Of Human Skin Keratinocytes And Perspectives On Their Use For Grafting Of Patients With Extensive Burns,"* Mayo Clinic Proc. 61:771-777).

[00415] En una realización específica, el ácido nucleico que se introducirá para los fines terapia génica comprende un promotor susceptible de inducirse ligado en forma operativa a la región de codificación, de manera tal que expression del ácido nucleico es controlable por el control de la presencia o ausencia del inductor apropiado de transcripción.

5.7.3 KITS

[00416] La invención proporciona un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con las moléculas de la invención. En forma adicional, uno o más otros agentes terapéuticos o profilácticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el pack o kit farmacéutico. La invención también proporciona un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los

ingedientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. En forma opcional asociados con dicho(s) recipiente(s) puede(n) ser una nota en la forma indicada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, cuya nota refleja la aprobación de parte de la agencia regulatoria de la fabricación, el uso o la venta para administración a los humanos.

[00417] La presente invención proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende una o más moléculas de la invención. En otra realización, un kit comprende, en forma adicional, uno o más otros agentes terapéuticos o profilácticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende, en forma adicional, uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos del cáncer asociados con cáncer. En ciertas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente terapéutico o profiláctico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

5.8 CARACTERIZACIÓN Y DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA

[00418] Varios aspects de las composiciones farmacéuticas, los agentes terapéuticos o profilácticos de la invención se analizan con preferencia *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo animal modelo, tales como un sistema modelo animal de roedor, para evaluar la actividad terapéutica deseada antes del uso en humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica, incluyen ensayos de cultivo celular en los cuales una muestra de tejido de un paciente se cultiva en cultivo, y se expone a o se hace contactar de otro modo con una composición farmacéutica de la invención, y el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido se observa. La muestra de tejido puede obtenerse por biopsia del paciente. Este análisis permite la identificación de la(s) molécula(s) profilácticas o terapéuticas más terapéuticamente efectivas para cada paciente individual. En varias realizaciones específicas, los ensayos *in vitro* pueden llevarse a cabo con tipos de células reprsentativas involucrados en un trastorno inflamatorio o autoinmune (*por ej.*, células T), para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto sobre dicho tipo de células.

[00419] Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden evaluarse en sistemas de modelos de animales apropiados antes de usar en humanos. Dichos modelos en animales incluyen, aunque no se limitan a, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, *etc*. Cualquier sistema animal conocido en la materia puede utilizarse. En una realización específica de la invención, las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos se analizan en un sistema de modelo de ratón. Dichos sistemas modelo se utilizan ampliamente y son muy conocidos para el artesano experimentado. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse en forma reiterada. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen el régimen temporal de administrar los agentes

profilácticos y/o terapéuticos, y si dichos agentes se administran en forma separada o como una mezcla.

[00420] Los modelos animales preferidos para usar en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos sobre células efectoras de ratón, *por ej.*, cualquier modelo animal descrito en U.S. 5,877,396 (que se incorpora en este documento a modo de referencia en su totalidad) puede usarse en la presente invención. Los ratones transgénicos para usar en los métodos de la invención incluyen, aunque no se limitan a, ratones que llevan FcγRIIIA humano; ratones que llevan FcγRIIA humano; ratones que llevan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones que llevan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano. Con preferencia, las mutaciones que muestran los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos con anterioridad se evaluarán para usar en estudios en modelos animales antes de usar en humanos. Pueden prepararse cantidades suficientes de los anticuerpos para usar en modelos animales con el uso de métodos descritos con anterioridad, por ejemplo con el uso de sistemas de expresión de mamíferos y métodos de purificación descritos y ejemplificados en este documento.

[00421] Los modelos de xenoinjerto de ratón pueden usarse para examinar la eficacia de anticuerpos de ratón generados contra un blanco específico del tumor basado en la afinidad y especificidad de los dominios de unión al epítope de la molécula de diacuerpo de la invención h la habilidad del diacuerpo de generar una respuesta inmunológica (Wu *et al.* (2001) *"Mouse Models For Multistep Tumorigenesis,"* Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los FcγR humanos que expresan ratones transgénicos sobre células efectoras de ratón son únicos y son modelos personalizados de animales para analizar la eficacia de interacciones Fc-FcγR humano. Los pares de líneas celulares de ratón transgénico FcγRIIIA, FcγRIIIB y FcγRIIA generadas en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (A través de un contrato de licencia con Rockefeller University y el Sloan Kettering Cancer Center) puede usarse tales como se enumeran en la **Tabla 11** a continuación.

Tabla 11: Cepas de ratones

Fondo de la Cepa	FcR Humano
Lampiño / CD16A KO	Ninguno
Lampiño / CD16A KO	FcγRIIIA
Lampiño / CD16A KO	FcγR IIA
Lampiño / CD16A KO	FcγR IIA and IIIA
Lampiño / CD32B KO	Ninguno
Lampiño / CD32B KO	FcγR IIB

[00422] La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invenciónpueden determinarse por medio del uso de varios modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la materia y descritos en Crofford L.J. and Wilder R.L., "*Arthritis*

and Autoimmunity in Animals", in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al.*(eds.), Chapter 30 (Lee and Febiger, 1993). Los modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunes también pueden usarse para evaluarla actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invención. Los siguientes son algunos ensayos provistos como ejemplos, y no como limitación.

[00423] Los principales modelos animales para artritis o enfermedad inflamatoria se conocidos en la materia y usados ampliamente incluyen: modelos de rata con artritis inducido por adyuvante, modelos de ratón y rata de artritis inducida por colágeno y modelos de conejo y hámster inducido por colágeno, todos descritos en Crofford L.J. and Wilder R.L., *"Arthritis and Autoimmunity in Animals"*, in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty *et al.*(eds.), Chapter 30 (Lee and Febiger, 1993), incorporados en este documento a modo de referencia en su totalidad.

[00424] La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invención puede evaluarse con el uso de un modelo de artritis de rata inducido por carragenina. La artritis inducida por carragenina también se ha usado en el conejo, perro y cerdo en estudios de artritis crónica o inflamación. La evaluación histomorfométrica cuantitativa se usa para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para usar dicho modelo de artritis inducida por carragenina se describen en Hansra P. *et al.* (2000) *"Carrageenan induced arthritis In The Rat,"* Inflamación, 24(2): 141-155. También se usan comúnmente los modelos animales de inflamación inducida por zymosan como se onoce y se describe en la la materia.

[00425] La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la invención también puede analizarse midiendo la inhibición de edema de la pata inducido por carragenina en la rata, con el uso de una modificación del término método que se describe en Winter C. A. *et al.* (1962) *"Carrageenan-Induced Edema In Hind Paw Of The Rat As An Assay For Anti-Inflammatory Drugs"* Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 544-547. Este ensayo se ha usado como selección primaria *in vivo* para determinar la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictivo de la eficacia humana. La actividad antiinflamatoria de los agentes terapéuticos o profilácticos de prueba se expresa como porcentaje de inhibición del aumento del peso de la pata trasera del grupo de prueba con relación al grupo de control que recibió vehículo.

[00426] En forma adicional, los modelos animales para enfermedad inflamatoria intestinal también pueden usarse para evaluar la eficacia de las terapias combinadas de la invención (Kim *et al.* (1992) *"Experimental Colitis In Animal Models,"* Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober (1985) *"Animal Models of Intestinal Inflammatory Disease --An Overview,"* Dig. Dis. Sci. 30(12 Suppl):3S-10S). La colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn son efermedades inflamatorias intestinales humanas que pueden inducirse en animales, Los polisacáridos sulfatados que incluyen, aunque sin limitarse a amilopectina, carragenina,

amilopectina sulfato, y dextran sulfato o irritantes químicos que incluyen aunque sin limitarse a ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a los animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias intestinales.

[00427] Los modelos animales para trastornos autoinmunes también pueden usarse para evaluar la eficacia de las terapias combinadas de la invención. Los modelos animales for trastornos autoinmunes tales como diabetes tipo 1, inmunidad de tiroides, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis se han desarrollado (Flanders *et al.* (1999) "*Prevention Of Typo 1 Diabetes From Laboratory To Public Health,"* Autoimmunity 29:235-246; Rasmussen *et al.* (1999) *"Models To Study The Pathogenesis Of Thyroid Autoimmunity,"* Biochimie 81:511-515; Foster (1999) *"Relevance Of Systemic Erithematous Lupus Nephritis Animal Models To Human Disease,"* Semin. Nephrol. 19:12-24).

[00428] Además, cualquier ensayo conocido por aquellas personas expertas en la materia puede usarse para evaluar la utilidad terapéutica y/o profiláctica de las terapias de combinación divulgadas en este documento para determinar enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes.

[00429] La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estánar en cultivos celulares o animales experimentales, *por ej.*, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD_{50}/ED_{50}. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos que exhiben grandes índices terapéuticos son los preferidos. Mientras que los agentes profilácticos y/o terapéuticos que exhiben efectos colaterales tóxicos pueden usarse, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija dichos agentes al sitio de tejido afectado para minizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos colaterales.

[00430] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un rango de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para usar en humanos. La dosificación de dichos agentes yace con preferencia dentro de un rango de concentraciones en la circulación que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango que depende de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un rango de concentración de plasma en circulación que incluye el IC_{50} (*es decir*, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para

determinar en forma más precisa las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía de alta resolución.

[00431] La actividad contra el cáncer de las terapias usadas de acuerdo con la presente invención también pueden determinarse por medio del uso de varios modelos animales experimentales para el estudio del cáncer tales como el modelo de SCID de ratón o ratones transgénicos o ratones lampiños con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsteres, conejos, *etc*. conocidos en la materia y desctitos en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig and Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven and Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher), incorporadas en este documento a modo de referencia en sus totalidades.

[00432] Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de las moléculas de la invención son los modelos de xenoinjerto de ratón. Las líneas celulares de tumor que pueden usarse como fuente de tumores de xenoinjerto incluyen aunque no se limitan a, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivar de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen ambos receptores erbB2 y prolactina. Las células SKBR3 se han usado como rutina en en la materia como ADCC y modelos de tumor para xenoinjerto. En forma alternativa, células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano pueden usarse como fuente de tumores de xenoinjerto.

[00433] Los protocolos y composiciones de la invención se analizan con preferencia *in vitro*, y luego *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de usar en humanos. Los agentes terapéuticos y métodos pueden seleccionarse con el uso de células de una línea celular maligna o de tumor. Muchos ensayos estándar pueden usarse para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede evaluarse midiendo la incorporación de ^{3}H-timidina, por recuento directo de células, por detección de cambios en la actividad de transcripción de genes conocidos tales como proto-oncógenos (*por ej.*, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tintura de azul de tripan, la diferenciación puede evaluarse visualmente en base a los cambios en la morfología, reducción del crecimiento y/o formación de colonias en agar suave o formación de nedosrk tubular en la membrana de base tridimensional o la preparación de la matriz extracelular, etc.

[00434] Los compuestos para usar en terapia pueden evaluarse en sistemas de modelos de animales apropiados antes de analizar en humanos, que incluyen aunque sin limitarse a, en ratas, ratones, pollo, vacas, monos, conejos, hámsteres, *etc.*, por ejemplo, los modelos animales descritos con anterioridad. Los compuestos pueden usarse luego en ensayos clínicos apropiados.

[00435] Además, cualquier ensayo conocidos por aquellas personas expertas en la materia puede usarse para evaluar la utilidad terapéutica y/o profiláctica de las terapias combinadas

divulgadas en este documento para el tratamiento o prevención del cáncer, trastorno inflamatorio, o enfermedad autoinmune.

6. EJEMPLOS

6.1 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

[00436] Un diacuerpo covalente monoespecífico y un diacuerpo covalente biespecífico se construyeron para evaluar la producción recombinante, características de purificación y unión de cada uno. Las moléculas de diacuerpo purificadas or afinidad que se produjeron por los sistemas de expresión recombinantes descritos en este documento se encontraron por SDS-PAGE y análisis SEC que consisten en una sola especie dimérica. El ELISA y el análisis SPR revelaron en forma adicional que el diacuerpo biespecífico covalente exhibió afinidad por ambos antígenos de destino y podría unirse a ambos antígenos en forma simultánea.

Materiales y métodos and Métodos*:*

[00437] ***Construcción y diseño de las moléculas de polipéptido:*** Los vectores de expresión de ácidos nucleicos se diseñaron para producir cuatro construcciones de polipéptidos, representadas en forma esquemática en la FIG. 2 . La construcción 1 **(SEC ID NRO.: 9)** comprendía el dominio VL de anticuerpo 2B6 humanizado, que reconoce FcγRIIB, y el dominio VH de anticuerpo 3G8 humanizado, que reconoce FcγRIIIA. La construcción 2 **(SEC ID NRO.: 11)** comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6. La construcción 3 **(SEC ID NRO.: 12)** comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8. La construcción 4 **(SEC ID NRO.: 13)** comprendía el dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6.

[00438] ***PCR y Construcción del Vector de expresión:*** Las secuencias de codificación de los dominios VL o VH se amplificaron a partir del ADN patrón con el uso de cebadores de avance e inversos diseñados de manera tal que los productos de PCR iniciales contendrían secuencias de superposición, permitiendo que la PCR superpuesta genere las secuencias de codificación de las construcciones de polipéptidos deseadas.

[00439] ***Amplificación de PCR inicial del ADN patrón:*** Aproximadamente 35 ng del ADN patrón, *por ej*. cadena liviana y cadena pesada del anticuerpo de interés; 1 ul de cebadores de avance e inversos 10 μM; 2,5 ul de 10x pfuUltra buffer (Stratagene, Inc.); 1 ul de 10 mM dNTP; 1 ul de 2,5 unidades/ul de pfuUltra ADN polimerasa (Stratagene, Inc.); y agua destilada hasta 25 ul de volumen total se mezclaron suavemente en tubo micrófugo y se centrifugó en forma sintética en un microcentrífugo para recolectar la mezcla de reacción en la parte inferior del tubo. Las reacciones por PCR reactions se realizaron con el uso de GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystem) y las siguientes configuraciones: 94°C, 2 minutos; 25 ciclos de 94°C, cada 15 segundos; 58°C, 30 segundos; y 72°C, 1 minuto.

[00440] El VL de Hu2B6 se amplificó a partir de la cadena liviana de Hu2B6 con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 56**, respectivamente. El

VH de Hu2B6 se amplificó a partir de la cadena pesada de Hu2B6 con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 57 y SEC ID NRO.: 58**, respectivamente. El VL de Hu3G8 se amplificó a partir de la cadena liviana de Hu3G8 con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 59**, respectivamente. El VH de Hu3G8 se amplificó a partir de la cadena pesada de Hu3G8 con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 60 y SEC ID NRO.: 61**, respectivamente.

[00441] Los productos de PCR se sometieron a electroforesis sobre 1% gel de agarosa durante 30 minutos a 120 voltios. Los productos de PCR se cortaron del gel y se purificaron con el Kit de Extracción MinElute GEl (Qiagen, Inc.).

[00442] ***PCR por superposición:*** Los productos de PCR iniciales se combinaron como se describe a continuación y se amplificaron con el uso de las mismas condiciones de PCR descritas para la amplificación inicial del patrón de ADN. Los productos de PCR por superposición también se purificaron como se describió con anterioridad.

[00443] La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 1, **SEC ID NRO.: 9** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **2**), se amplificó por combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de VL Hu2B6 y VH Hu3G8, y cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 61**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 2, **SEC ID NRO.: 11** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **2**), se amplificó por combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de VL Hu3G8 y VH Hu2B6, y cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 58**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 3, **SEC ID NRO.: 12** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **2**), se amplificó por combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de VL Hu3G8 y VH Hu3G8, y cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 61**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 4, **SEC ID NRO.: 13** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **2**), se amplificó por combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de VL Hu2B6 y VH Hu2B6, y cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 58**, respectivamente.

[00444] Los cebadores de avance de los dominios VL (*es decir*, **SEC ID NRO.: 55**) y cebadores inversos de los dominios VH (*es decir*, **SEC ID NRO.: 58** y SEC ID NRO**.: 61**) contenían sitios de restricción únicos para permitir la clonación del producto final en un vector de expresión. Los productos purificados superpuestos de PCR se digirieron con endonucleasas de restricción Nhe I y EcoR I, y se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.). Los plásmidos que codifican construcciones se diseñaron como se identificó en la Tabla **12**:

Tabla 12. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS

Que codifica la construcción	Plasmid Designation	Insert

1	pMGX0669	hu2B6VL-hu3G8VH
2	pMGX0667	hu3G8VL-hu2B6VH
3	pMGX0666	hu3G8VL-hu3G8VH
4	pMGX0668	hu2B6VL-hu2B6VH

[00445] ***Expresión de polipéptido/diacuerpo:*** pMGX0669, que codifica la construcción 1,was cotransfected con pMGX0667, que codifica la construcción 2, en las células HEK-293 con el uso de Lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La co-transfección de estos dos plásmidos se diseñó para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico covalente (CBD) immunoespecífica para ambos FcγRIIB y FcγRIIIA (el diacuerpo h2B6-h3G8). pMGX0666 y pMGX0668, construcciones de codificación 3 y 4, respectivamente, se transfectaron en forma separada en células HEK-293 para determinar la expresión de un diacuerpo monoespecífico covalente (CMD), immunoespecífica para FcγRIIIA (diacuerpo h3G8) y FcγRIIB (diacuerpo h2B6), respectivamente. Luego de tres días en cultivo, los productos secretados se purificaron de los medios acondicionados.

[00446] ***Purificación*****:** Los diacuerpos se capturaron del medio acondicionado con el uso de los antígenos relevantes acoplados a Sepharose 4B activado con CNBr. La resina por afinidad Sepharose se equilibró en 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 antes de cargar. Después de cargar, la resina se lavó con buffer de equilibrio antes de la elución. Los diacuerpos se eluyeron de la resina lavada con el uso de 50 mM Glicina pH 3,0. Los diacuerpos eluidos se neutralizaron inmediatamente con 1M Tris/HCl pH 8,0 y se concentraron con el uso de un concentrador del tipo de centrifugado. Los diacuerpos concentrados se purificaron en forma adicional cromatografía por exlcusión de tamaño con el uso de una columna Superdex 200 equilibrada en PBS.

[00447] ***SEC:*** Se usó cromatografía por exclusión de tamaño para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de los diacuerpos eluidos de la columna. El análisis SEC se realizó en una columna GE healthcare Superdex 200HR 10/30 equilibrada con PBS. La comparación con los perfiles de elución de una IgG de longitud completa (~150 kDa), un fragmento Fab (~50 kDa) y un Fv de cadena simple (~30 kDa) se usaron como controles).

[00448] ***ELISA:*** La unión de diacuerpos eluidos y purificados se caracterizó por ensayo ELISA, como se describe en la 5.4.2. 50 ul/pocillo de una solución a 2 μg/ml de sCD32B-Ig se recubrió en placa Maxisorp de 96 pocillos en buffer de carbonato a 4^0C hasta la mañana siguiente. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, 0,1% Tween 20) y se bloqueo por 0,5% BSA en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, h2B6-h3G8 CBD, h2B6 CMD, o h3G8 CMD se diluyeron en el buffer de bloqueo en una dilución serial en dos veces para generar un rango de concentraciones de diacuerpo, desde 0,5 μg/ml hasta 0,001 μg/ml. La placa se incubó a continuación a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después del lavado con PBS-T tres veces, 50 ul/pocillo de 0,2 ug/ml sCD16A-Biotin se agregó a cada pocillo. La placa se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado con PBS-T tres veces, 50 ul/pocillo de una dilución 1:5000 de Estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) se usó para detección. La HRP-estreptavidina se dejó incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se desarrolló con el uso de 80 ul/pocillo de sustrato de TMB. Después de una incubación de 10 minutos, la reacción de HRP-TMB se detuvo por el agregado de 40 ul/pocillo de 1% H_2SO_4. El OD450 nm se leyó por medio del uso de un lector de placas de 96 pocillos y software SOFT max, y los resultados se graficaron con el uso de software GraphPadPrism 3.03.

[00449] ***Ensayo BIAcore:*** Los parámetros cinéticos de la unión de diacuerpos eluidos y purificados se analizaron con el uso de un ensayo BIAcore (BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.) y el software asociado como se describe en la Sección 5.4.3.

[00450] sCD16A, sCD32B o sCD32A (control negativo) se inmovilizaron sobre una de las cuatro células de flujo (célula de flujo 2) de una superficie del chip sensor a través de química de acoplamiento de amina (por modificación de los grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de manera tal que alrededor de 1000 unidades de respuesta (RU) de cualquiera de receptor se inmovilizó sobre la superficie. Luego de esto, los ésteres activos no reaccionados se “destaparon” con una inyección de 1M Et-NH2. Una vez que la superficie apropiada se preparó, losdiacuerpos biespecíficos covalentes (h2B6-h3G8 CBD) o diacuerpos monoespecíficos covalentes (h2B6 CMD o h3G8 CMB) se pasaron sobre la superficie por inyecciones de 180 segundos de una solución 6,25-200nM a un caudal de flujo de 70 mL/min. h3G8 scFV también se evaluó por comparación.

[00451] Una vez recolectados los datos completos, las curvas de unión resultantes se adaptaron en forma global con el uso de algoritmos para computadoras provistos por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan ambos el K_{on} y K_{off}, a partir de los cuales la constante de unión en equilibrio aparente, K_D se deduce como la proporción de las dos constantes de velocidad (*es decir*, K_{off}/K_{on}). Los tratamientos más detallados de cómo derivan las constantes de índice individual pueden encontrarse en el BIAevaluaion Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

[00452] Las fases de asociación y disociación se adaptaron por separado. La constante del índice de disociación se obtuvo para el intervalo 32-34 seg de la fase de disociación de 180 seg; la curva de la fase de disociación se obtuvo por un modelo de 1:1 Langmuir y el accesorio de la base se seleccionó en base los criterios de R_{max} y chi^2 para los diacuerpos biespecíficos y scFv; La curva del analito bivalente se usó para unión a CMD.

[00453] Resultados

[00454] El análisis por SDS-PAGE en condiciones no reducidas reveló que el producto purificado de los sistemas de expresión h3G8 CMD, h2B6 CMD y h2B6-h3G8 CBD eran

cada uno una sola especie con un peso molecular estimado de aproximadamente 50 kDa **(FIG. 3, hileras 4, 5 y 6, respectivamente)**. En condiciones de reducción, el producto purificado de cualquiera de los sistemas de expresión de CMD corridos como un único por (**hileras 1 y 2)**, mientras que el producto purificado del sistema h2B6-h3G8 CBD se reveló que era 2 proteínas separadas **(FIG. 3, hilera 3)**. Todos los polipéptidos separados del sistema de expresión y visualizados por SDS-PAGE en condiciones de reducción migraron a aproximadamente 28 kDa.

[00455] El análisis SEC de cada uno de los productos del sistema de expresión también revelaron una sola especie molecular **(FIG. 4B)**, cada uno de los cuales eluyó al mismo tiempo aproximado que un fragmento Fab de IgG (~50kDa) **(FIG. 4A)**. El producto indica que el producto purificado por afinidad fue un homodímero covalente homogéneo para el caso del sistema de expresión CMD y un heterodímero covalente homogéneo para el caso de h2B6-h3G8 CBD.

[00456] Un ensayo ELISA sándwich se usó para evaluar la unión de h2B6-h3G8 CBD para especificidad con cualquiera o ambos de CD32B y/o CD16A **(FIG. 5)**. CD32B sirvió como el antígeno de destino y CD16A se usó como la sonda secundaria. La señal positiva en el ELISA reveló que el h2B6-h3G8 CBD heterodimérico tenía especificidad por ambos antígenos. El análisis similar del h3G8 CMD (que no se unió a CD32B) showed no signal.

[00457] El análisis por SPR indicó que h3G8 CMD reconoció en forma inmunoespecífica a sCD16 pero no sCD32B, que h2B6 CMD reconoció en forma inmunoespecífica a sCD32B pero no sCD16, y que h2B6-h3G8 CBD reconoció en forma inmunoespecífica a both sCD16 y sCD32B **(FIGS. 6A-B)**. Ninguno de los diacuerpos analizados se unió al receptor de control, sCD32A (FIG. 6C).

[00458] El análisis por SPR se usó además para estimar la cinética y las constantes de equilibrio de CMDs y h2B6-h3G8 CBD para sCD16 y/o sCD32B. Los resultados se compararon con las mismas constantes calculadas para un h3G8 scFV. Las **FIGS. 7A-E** muestran los resultados gráficos del análisis SPR. La cinética de los índices on y off, así como también la constante de equilibrio, calculada a partir de los resultados mostrados en la FIG. **7** se presentan en en la Tabla **13**.

Tabla 13. Constantes de cinética y equilibrio calculadas a partir de los datos BIAcore.

Receptor / Analito	k-on	k-off	Kd
sCD16 / diacuerpo h3G8	**2,3 x10^5**	**0,004**	**18,0**
sCD16 / h2B6-h3G8 CBD	**4,6 x 10^5**	**0,010**	**22,7**
sCD16 / h3G8 scFv	**3,2 x 10^5**	**0,013**	**38,7**
sCD32B / h2B6-h3G8 CBD	**3,6 x 10^5**	**0,005**	**15,0**
sCD32B / diacuerpo h2B6	**6,2 x 10^5**	**0,013**	**21,0**

[00459] Acoplados con los resultados del análisis ELISA, los estudios confirman que el heterodímero covalente h2B6-h3G8 retuvo especificidad por ambos CD32B y CD16, y era capaz de unir ambos antígenos en forma simultánea. La molécula está representa en forma esquemática en la FIG. **8**.

6.2 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc

[00460] In en un esfuerzo de crear una molécula con aspecto de, *es decir*, que comprende un dominio Fc, uno de los polipéptidos que comprenden la molécula heterodimérica presentada en el Ejemplo 6.1 se modificó para comprender en forma adicional un dominio Fc (creando una cadena 'más pesada' y 'más liviana', análoga a una cadena liviana y pesada del anticuerpo). La molécula biespecífica heterodimérica contendrían entonces un dominio Fc que se dimerizará con una molécula homóloga, formando una molécula tetramérica con estructura de IgG con tetravalencia (*es decir*, formada por dimerización por medio de los dominios Fc de las las moléculas biespecíficas heterodiméricas). En forma interesante, dichas moléculas tetraméricas no se detectaron en los medios acondicionados de sistemas de expresión recombinantes con el uso de ensayos funcionales, *por ej.*, análisis de los medios acondicionados para unir en forma inmunoespecífica un antígeno de destinos. En su lugar, sólo una molécula dimérica, que comprende monómeros que consisten en un dominio VL, VH y Fc, se detectaron en dichos ensayos funcionales. Para analizar si la estabilidad de la estructura tetramérica teórica estaba en juego, se diseñaron polipéptidos que comprenden el dominio Fc para comprender en forma adicional a región de bisagra mientras que los polipéptidos que comprenden la cadena 'más liviana' se diseñaron para comprender en forma adicional los 6 aminoácidos de extremo terminal C del dominio constante de la cadena liviana kappa humana. Cuando dichas cadenas re-diseñadas 'más pesada' y 'más liviana se co-expresaron en los sistemas de expresión recombinantes, ensayos funcionales detectados en las moléculas de diacuerpo que fueron capaces de unirse inmunológicamente en forma específica a ambos los antígenos de destino y los anticuerpos anti-Fc.

[00461] Materiales y Métodos

[00462] ***Construcción y diseño de las moléculas de polipéptido:*** Los vectores de expresión de ácidos nucleicos se diseñaron para producir versiones modificadas de construcciones 1 y 2 presentada en el Ejemplo 6.1. La construcción 5 **(SEC ID NRO.: 14)** y 6 **(SEC ID NRO.: 15)**, se crearon diseñando la construcción 1 y 2, respectivamente para comprender en forma adicional un dominio Fc. La construcción 7 **(SEC ID NRO.: 16)** se creó diseñando la construcción 1 para comprender en forma adicional la secuencia FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)** en su extremo terminal C. La construcción 8 **(SEC ID NRO.: 18)** se creó diseñando la construcción 2 para comprender en forma adicional una región de bisagra un dominio Fc (que comprende la mutación V215A). La representación esquemática de construcciones 5-8 se muestra en la **FIG. 9**.

[00463] ***PCR y Construcción del Vector de expresión:*** Todos los protocolos de PCR y purificación del producto por PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 Plasmids pMGX0669 y pMGX0667 sirvieron como patrones para las secuencias de codificación de las construcciones 1 y 2, respectivamente. Las secuencias de codificación para el dominio Fc HuIgG y/o dominio de bisagra fueron **SEC ID NRO.: 5** o **SEC ID NRO.: 1 y SEC ID NRO.: 5**, respectivamente. Las secuencias de codificación de los ADN patrón se amplificaron con el uso de cebadores de avance e inversos de manera tal que los productos de PCR contendrían secuencias de superposición, permitiendo que la PCR superpuesta genere las secuencias de codificación de los productos deseados.

[00464] La secuencia de codificación de la construcción 1 se amplificó a partir de pMGX0669 con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 62**, respectivamente. La secuencia de codificación de la construcción 2 se amplificó a partir de pMGX0667 con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 63**, respectivamente. HuIgG hinge-Fc se amplificó con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 65** y SEC ID NRO**.: 66**, respectivamente. La construcción 7 **(SEC ID NRO.: 16)** se amplificó a partir de pMGX0669 con el uso de cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 67**.

[00465] ***PCR por superposición***: Los productos iniciales de PCR se combinaron como se describe a continuación, se amplificaron y se purificaron como se describe en el Ejemplo 6.1.

[00466] La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 5, **SEC ID NRO.: 14** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **9**), se amplificó por combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de la construcción 1 y HuIgG Fc, y cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 64**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 6, **SEC ID NRO.: 15** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **9**), se amplificó por combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y HuIgG Fc, y cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 66**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 8, **SEC ID NRO.: 18** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **9**), se amplificó por combinación de los productos de PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y HuIgG hinge-Fc, y cebadores de avance e inversos **SEC ID NRO.: 55** y SEC ID NRO**.: 66**, respectivamente.

[00467] Los productos finales se clonaron en el vector de expresión pCIneo de mamífero(Promega, Inc.) como se describió con anterioridad. Las construcciones de plásmidos de codificación se diseñaron como se identificó en la Tabla **14**:

Tabla 14. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS

Construcción de codificación	Designación del plásmido	Inserción
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3G8VL-hu2B6VH-hu hinge-Fc (A215V)

[00468] ***Expresión de polipéptido/diacuerpo:*** Cuatro co-transfecciones separadas en en las células HEK-293 con el uso de Lipofectamina 2000, como se describe en la Sección 6,1, se realizaron: pMGX0669 y pMGX0674, construcciones de codificación 1 y 6, respectivamente; pMGX0667 y pMGX0676, construcciones de codificación 2 y 5, respectivamente; y pMGX0677 y pMGX0678, construcciones de codificación 7 y 8, respectivamente.

[00469] La co-transfección de estos plásmidos se diseñó para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura similar a IgG, immunoespecífica para ambos FcγRIIB y FcγRIIIA. También se realizó una transfección adicional: pMGX0674 y pMGX0676, construcciones de codificación 6 y 5, respectivamente. Luego de tres días en cultivo, se cosechó el medio acondicionado. La cantidad de producto secretado en el medio acondicionado se cuantificó por anti IgG Fc ELISA con el uso de Fc purificado como estándar. Las concentraciones de producto en las muestras se normalizó a continuación en base a la cuantificación, y las muestras normalizadas se usaron para los ensayos restantes.

[00470] ***ELISA:*** La unión de moléculas de diacuerpo secretadas en el medio se analizó por ELISA sándwich como se describió, *supra*. Salvo que se indique, CD32B se usó para recubrir la placa, *es decir*, como proteína blanco, y CD16 conjugado con HRP se usó como sonda**.**

[00471] Resultados

[00472] Un ensayo ELISA se usó para analizar las muestras normalizadas de los sistemas de expresión recombinantes que comprenden las construcciones 1 y 6 (pMGX669-pMGX674), construcciones 2 y 5 (pMGX667-pNGX676) y construcciones 5 y 6 (pMGX674-pMGX676) para determinar la expresión de moléculas de diacuerpo capaces de unión simultánea a CD32B y CD16A **(FIG. 10)**. Los datos de ELISA indicaron que la co-transfección con construcciones 1 y 6 o co-transfección con construcciones 2 y 5 no lograron elaborar un producto que pudiera unirse a cualquiera o ambos antígenos (**FIG. 10**, □ y ▲, respectivamente). Sin embargo, la co-transfección construcciones 5 y 6 conduce a la secreción de un producto capaz de unirse a ambos antígenos CD32B y CD16. El último producto era un dímero de construcciones 5 y 6, que contienen un sitio de unión para cada antígeno con una estructura que se muestra en forma esquemática en la FIG. **11**.

[00473] Con el fin de conducir la formación de una estructura heterotetramérica con estructura de IgG, la secuencia de codificación para seis aminoácidos adicionales se anexó al extremo terminal C de la construcción 1, generando la construcción 7 (**SEC ID NRO.: 16** y se muestra esquemáticamente en la FIG. **9**). Los seis aminoácidos adicionales, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**, derivaron del extremo terminal C de la cadena liviana Kappa y normalmente interactúan con el dominio superior de bisagra de la cadena pesada en una molécula de IgG. Un dominio de bisagra se diseñó luego en la construcción 6, generando la construcción 8 **(SEC ID NRO.: 18 and FIG. 9)**. La construcción 8 en forma adicional comprendía una mutación de aminoácidos en la regón superior de bisagra, A215V. La construcción de codificación de plásmidos de expresión 7 y la construcción 8, pMGX677 y pMGX678, respectivamente, luego se co-transfectaron en células HEK-293 y se expresan como se describió.

[00474] Las moléculas del diacuerpo producido del sistema de expresión recombinante que comprende construcciones 7 y 8 (pMGX0677 + pMGX0678), se compararon en un ensayo ELISA para determinar la unión de CD32B y CD16A a moléculas de diacuerpo producidas a partir de los sistemas de expresión que comprenden las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674), construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678), y construcciones 6 y 7 (pMGX677 + pMGX674) **(FIG. 12)**.

[00475] Como antes, la molécula produced por el sistema de expresión que comprende construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674) demostraron que son incapaces de unirse tanto a CD32A como CD16A **(FIG. 10 y FIG. 12)**. En contraste, el producto de la co-expresión de cualquiera de construcciones 7 y 6 (pMGX0677 + pMGX0674) o de la co-expresión de las construcciones 7 y 8 (pMGX0677-pMGX0678) fueron incapaces de unirse a ambos CD32B y CD16 **(FIG. 12)**. Se observa que la construcción 7 es análoga para construir 1, con excepción de que la construcción 7 comprende la secuencia de extremo terminal C FNRGEC **(SEC ID NO:23)**; y que la construcción 8 es análoga a la construcción 6, excepto que la construcción 8 comprende un dominio de bisagra y la mutación A215V. Los datos indican que la incorporación de los 6 aminoácidos extra del extremo terminal C de la cadena liviana C-kappa (FNRGEC; **SEC ID NRO.: 23**) a la cadena ‘más liviana’ que no lleva Fc ayudó a estabilizar la formación de las moléculas de diacuerpo con estructura de IgG tetraméricas, sin importar si la correspondiente cadena más pesada comprendía un dominio de bisagra (*es decir*, pMGX0677 + pMGX0674 y pMGX0677-pMGX0678, **FIG. 12**). El agregado del término dominio de bisagra al Fc que lleva polipéptido ‘más pesado’, sin el agregado de FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)** de la secuencia de extremo terminal C a la correspondiente cadena ‘más liviana’, fue aparentemente incapaz de efectuar estabilización similar (*es decir*, la falta de unión del producto de la co-transfección de las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678)). La estructura de la molécula tetramérica del diacuerpo está representada en forma esquemática en la FIG. **13**.

6.3 EFECTO DE ORDEN DE DOMINIO Y LOS ENLACES ADICIONALES DE DISULFURO SOBRE LA FORMACIÓN DE DIACUERPO TETRAMÉRICO CON ESTRUCTURA DE IgG

[00476] El efecto de la estabilización adicional entre las cadenas de polipéptidos más "livianas" y "pesadas" del molécula tetramérica con estructura de IgG del diacuerpo se investigó por sustitución de los residuos seleccionados sobre las cadenas de polipéptidos con cisteínas. The additional cisteína residues proveen los enlaces adicionales de disulfuro entre las cadenas 'más pesada' y 'más liviana'. En forma adicional, el orden de dominio sobre la actividad de unión se investigó por movimiento del dominio Fc o el dominio Fc de bisagra del extremo terminal C de la cadena de polipeptido al extremo terminal N. Aunque la actividad de unión de la molécula que comprende los enlaces de disulfuro adicionales no se alteró con relación a las moléculas construidas anteriormente de diacuerpo con dichos enlaces, la transferencia del dominio Fc o dominio Fc de bisagra al extremo terminal N de la cadena de polipéptido 'más pesada' que comprende el diacuerpo mejoró en forma sorprendente la afinidad de unión y/o avidez de la molécula biespecífica a uno o ambos de sus antígenos de destino.

Materiales y métodos

[00477] ***Construcción y diseño de las moléculas de polipéptido:*** Los vectores de expresión de ácidos nucleicos se diseñaron para producir versiones modificadas de construcciones 5, 6 y 8 presentadas en el Ejemplo 6.2. La construcción 9 **(SEC ID NRO.: 19)** y la construcción 10 **(SEC ID NRO.: 20)** (ambas se muestran esquemáticamente en la FIG. **13**) fueron análogos a las construcciones 8 y 6, con excepción de que el dominio Fc o dominio de bisagra Fc, respectivamente, se conmutó del extremo terminal C del polipéptido al extremo terminal N. En forma adicional todos los dominios Fc usados fueron dominios Fc tipo salvaje de IgG1. La construcción 11, **SEC ID NRO.: 21**, (se muestra esquemáticamente en la FIG. **14**) fue análoga a la construcción 2 del Ejemplo 6.1 excepto que el extremo terminal C se diseñó para comprender en forma adicional la secuencia FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**. La construcción 12, **SEC ID NRO.: 22** (se muestra esquemáticamente en la FIG. **14**) fue análoga a la construcción 5 del Ejemplo 6.2 excepto que el dominio Fc además comprendía a región de bisagra. Además, para las construcciones 11 y 12, el dominio 2B6 VL y dominio 2B6 VH comprendía una modificación simple de la cadena de aminoácidos (G105C y G44C, respectivamente) de manera tal que una glicina en cada dominio se reemplazó por cisteína.

[00478] ***PCR y Construcción del Vector de expresión:*** Todos los protocolos de PCR y purificación del producto por PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 y 6,2

[00479] ***PCR por superposición*:** Los productos finales se construyeron, se amplificaron y se purificaron con el uso de métodos descritos in Ejemplo 6.1 y Ejemplo 6.2.

[00480] Los productos finales se clonaron en el vector de expresión pCIneo de mamífero(Promega, Inc.) como se describió con anterioridad. Las construcciones de plásmidos de codificación se diseñaron como se identificó en la **Tabla 15**:

Tabla 15. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS

Construcción de codificación	Designación del plásmido	Inserción
9	pMGX0719	Huhinge/Fc -hu3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc -hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-huhingeFC
12	pMGX0717	Hu3G8VL-hu2B6VH (G/C)-FNRGEC

[00481] ***Expresión de polipéptido/diacuerpo:*** Tres co-transfecciones separadas en las células HEK-293 con el uso de Lipofectamina 2000, como se describe en la Sección 6,1, se realizaron: pMGX0669 y pMGX0719, construcciones de codificación 1 y 9, respectivamente; pMGX0669 y pMGX0718, construcciones de codificación 1 y 10, respectivamente; y pMGX0617 y pMGX0717, construcciones de codificación 11 y 12, respectivamente. La co-transfección de estos plásmidos se diseñó para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura similar a IgG, immunoespecífica para ambos FcγRIIB y FcγRIIIA. Luego de tres días en cultivo, se cosechó el medio acondicionado. La cantidad de producto secretado en el medio acondicionado se cuantificó por anti IgG Fc ELISA con el uso de Fc purificado como estándar. Las concentraciones de producto en las muestras luego se normalizaron en base a la cuantificación, y las muestras normalizadas se usaron para los ensayos restantes.

[00482] ***ELISA:*** La unión de moléculas de diacuerpo secretadas en el medio se analizó por ELISA sándwich como se describió, *supra*. Salvo que se indique, CD32B se usó para recubrir la placa, *es decir*, como proteína blanco, y CD16 conjugado con HRP se usó como sonda.

[00483] ***Transferencia Western:*** Aproximadamente15 ml del medio acondicionado de las tres co-transfecciones descritas con anterioridad se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reducidas. Se tiñó un gel con Simply Blue Safestain (Invitrogen) and un gel idéntico se transfirió a membrana de PVDF (Invitrogen) con el uso de métodos de transferencia estándar. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con 5% leche descremada en polvo en 1X PBS. La membrana luego se incubó en 10 ml de 1:8.000 IgG1 H+L anti humano de Cabra conjugado con HRP diluido en 2% leche descremada en polvo 1XPBS/0,1% Tween 20 a temperatura ambiente durante 1 hr con suave agitación. Luego de un lavado con 1X

PBS/0,3% Tween 20, 2X 5 min each, luego 20 min a temperatura ambiente, la membrana se desarrolló con el sistema de detección de Transferencia Western ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La película se desarrolló en el procesador de rayos X.

[00484] Resultados

[00485] Los medios acondicionados de los sistemas de expresión recombinantes que comprenden las construcciones 1 y 9; construcciones 1 y 10; y construcciones 11 y 12 se analizaron por análisis SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) y transferencia Western (usando un anti-IgG como sonda). La transferencia Western reveló que el producto de los sistemas que comprenden las construcciones 11 y 12 o que comprenden las construcciones 9 y 1 formaron de manera predominante una especie simple de molécula de aproximadamente 150 kDa (**FIG. 14**, **hileras 3 y 2,** respectivamente). Ambos de estos productos tienen enlaces de disulfuro internos diseñados entre las cadenas 'más liviana' y 'más pesada' que comprende el diacuerpo. En contraste, la molécula sin los enlaces de disulfuro internos diseñados entre las cadenas 'más liviana' y 'más pesada', formados a partir de las construcciones 10 y 1, formaron por lo menos dos especies moleculares de pesos moleculares ~75 y ~100 kDa (**FIG. 14**, **hilera 1**).

[00486] A pesar de los resultados de la transferencia Western, cada uno de los tres productos se encontró capaz de unirse a ambos CD32A y CD16 **(FIG. 15)**. En forma sorprendente, con relación al producto que comprende un dominio Fc de bisagra de extremo terminal C (formado por las construcciones 11 y 12), el producto de ambos sistemas en donde el dominio Fc (o bisagra -Fc) estaba en el término amino de la cadena de polipéptidos que contiene Fc (*es decir*, la cadena 'más pesada' chain) (construcciones 9+1 y construcciones 10+1) demostraron afinidad potenciada y/o avidez por uno o ambos de sus péptidos de destino (*es decir* CD32B y/o CD16).

6.4 EFECTO DEL SITIO DE DISOCIACIÓN INTERNA/EXTERNA SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNAS Y EXPRESIÓN DE DIACUERPO COVALENTE BIESPECÍFICO; DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPO BIESPECÍFICO QUE COMPRENDE PORCIONES DE IgG HUMANA DE CADENA LAMBDA Y DOMINIO DE BISAGRA

[00487] Como se describió en este documento, las cadenas de polipéptidos individuales del diacuerpo o molécula del diacuerpo de la invención puede expresarse como una molécula individual del precursor de poliproteínas. La capacidad de los sistemas recombinantes descritos en los Ejemplos 6,1-6,3 para procesar y expresar apropiadamente un CBD funcional de dicho precursor de poliproteínas se analizó por diseño de un ácido nucleico para codificar, tanto la primera como la segunda cadena de polipéptidos de un CBD separado por un sitio de

disociación interno, en particular, un sitio de separación de furina. El CBD funcional se aisló del sistema recombinante que comprende la molécula precursora de poliproteínas.

[00488] Como se discute en el Ejemplo 6.3, se encontró que el agregado de los 6 aminoácidos del extremo terminal C de la cadena liviana kappa humana, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**, estabiliza la formulación de diacuerpos -- supuestamente a través de la potenciada interacción entre cadenas entre los dominios que comprenden la SEC ID NRO**.: 23** y aquellos dominios que comprenden un dominio Fc o un dominio Fc-bisagra. El efecto de estabilización de esta interacción similar a la cadena lambda/Fc se analizó en CBD en donde ninguna cadena de polipéptido comprendía un dominio Fc. Una cadena de polipéptido del diacuerpo se diseñó para comprender **SEC ID NRO.: 23** en su extremo terminal C; la cadena de polipéptido socia se diseñó para comprender la secuencia de aminoácidos VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**, que derivó del dominio de bisagra de un IgG. La comparación de este CBD con el que comprendía las construcciones 1 y 2 (del Ejemplo 6.1) reveló que el CBD que comprende los dominios derivados de dominio de bisagra y cadena lambda exhibieron afinidad levemente superior por uno o ambos de sus epítopes de destino.

Materiales y métodos

[00489] ***Construcción y diseño de las moléculas de polipéptido:*** Precursor de poliproteínas: Los vectores de expresión de ácidos nucleicos se diseñaron para producir 2 poyproteína precursor moléculas, ambos representados esquemáticamente en la **FIG. 17**. La construcción 13 (**SEC ID NRO.: 95)** comprendía del extremo terminal N de la cadena de polipéptidos, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2,4G2 (que se une mCD32B), un sitio de separación de furina, el dominio VL de 2,4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos construcción de codificación 13 se proporciona en la **SEC ID NRO.: 96**. La construcción 14 **(SEC ID NRO.: 97) (FIG. 17)**, comprendía del extremo terminal N de la cadena de polipéptidos, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2,4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de separación de furina, un sitio de FMD (Proteasa del Virus de la Enfermedad de Pies y Boca C3), el dominio VL de 2,4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos construcción de codificación14 se proporciona en la **SEC ID NRO.: 98**.

[00490] Los vectores de expresión de ácidos nucleicos se diseñaron para producir versiones modificadas de construcciones 1 y 2 presentada en el Ejemplo 6.1. La construcción 15 (**SEC ID NRO.: 99) (FIG,17)** fue análoga a la construcción 1 **(SEC ID NRO.: 9)**, presentada en el Ejemplo 6.1, con excepción de que el extremo terminal C de la construcción 15 comprendía la secuencia de aminoácidos FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)**. La secuencia de ácido nucleico construcción de codificación 15 se proporciona en la **SEC ID NRO.: 100**. La construcción 16 **(SEC ID NRO.: 101) (FIG. 17)** fue análoga a la construcción 2, presentada en el Ejemplo 6.1, con excepción de que el extremo terminal C de la construcción 16 comprendía la secuencia de aminoácidos VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**. La secuencia de ácido nucleico construcción de codificación16 se proporciona en la **SEC ID NRO.: 102**.

[00491] ***PCR y Construcción del Vector de expresión:*** Todos los protocolos de PCR y purificación del producto por PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 y 6,2

[00492] ***PCR por superposición*:** Los productos finales se construyeron, se amplificaron y se purificaron con el uso de métodos descritos en el Ejemplo 6.1 y Ejemplo 6.2 con los cebadores apropiados

[00493] Los productos finales se clonaron en el vector de expresión pCIneo de mamífero(Promega, Inc.) como se describió con anterioridad. Las construcciones de plásmidos de codificación se diseñaron como se identificó en la Tabla **16**:

Tabla 16. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS

Construcción de codificación	Designación del plásmido	Inserción
13	pMGX0750	3G8VL-2,4G2VH-Furin-2,4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6VL-Hu3G8VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3G8VL-Hu2B6VH-VEPKSC

[00494] ***Expresión de polipéptido/diacuerpo:*** Una transfección y una co-transfección en las células HEK-293 con el uso de Lipofectamina 2000, como se describe en la Sección 6,1, se realizaron: simple: pMGX0750, construcción de codificación13; y co-transfección: pMGX0752 y pMGX0753, construcciones de codificación 15 y 16, respectivamente. Luego de tres días en cultivo, se cosechó el medio acondicionado, y producto secretado affinity purified as described.

[00495] ***ELISA:*** La unión de moléculas de diacuerpo secretadas en el medio se analizó por ELISA sándwich como se describió, *supra*. Se usó CD32B Murino para recubrir la placa, *es decir*, como proteína blanco, y CD16 conjugado con HRPA se usó como sonda para el producto de la co-transfección de construcciones 15 y 16. mCD32B se usó como la proteína de destino y CD16A conjugado con biotina se usó como sonda para el sistema recombinante que comprende la construcción 13.

Resultados

[00496] Los medios acondicionados de los sistemas de expresión recombinantes que comprenden las construcciones 13 se analizó por ELISA sándwich. El ensayo ELISA analizó la unión de CBD para especificidad con cualquiera o ambos de mCD32B y/o CD16 **(FIG. 18)**. CD32B sirvió como el antígeno de destino y CD16A se usó como la sonda secundaria. La señal positiva en el ELISA reveló que el CDB h2,4G2-h3G8 heterodimérico producido del precursor de poliproteínas tenía especificidad por ambos antígenos.

[00497] En forma similar, el producto purificado generado por co-transfección de las construcciones de codificación de los vectores15 y 16 se analizó en un ensayo ELISA y se comparó con el producto formado por las construcciones 1 y 2 (Ejemplo 6.1). CD32B sirvió como el antígeno de destino y CD16A se usó como la sonda secundaria. Como ocurrió con el producto formado por las construcciones 1 y 2, el producto de construcciones 15 y 16 se encontró que es capaz de unirse simultáneamente a CD32B y CD16A. De hecho, el producto de construcciones 15 y 16 mostró afinidad levemente potenciada por uno o ambos de los antígenos de destino, *es decir* CD32B o CD16A. Esto quizás se debe al aumento en la estabilidad y/o fidelidad (con relación a la interacción del dominio VH-VL tipo salvaje) de la asociación entre cadenas enfrentada por la interacción de región de cadena lambda, FNRGEC **(SEC ID NRO.: 23)** y región de bisagra VEPKSC **(SEC ID NRO.: 77)**, que está ausente en el producto formado por las construcciones 1 y 2.

6.5 USO DE REACTIVOS DE REORIENTACIÓN DE AFINIDAD DUAL (“DARTs”) PARA LIGAR MÚLTIPLES AFINIDADES ENTRE SÍ

[00498] Un aspecto de la presente invención se refiere a nuevos reactivos de reorientación de afinidad dual (“DARTs”) así como también nuevos modos de ligar entre sí múltiples afinidades. Los “DARTS” pueden ser monoespecíficos, biespecífico, triespecíficos, etc., de este modo siendo capaz de unirse en forma simultánea a uno, dos, tres o más epítopes (que pueden ser de iguales o diferentes antígenos). Los “DARTS” pueden en forma adicional ser monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, hexavalentes, etc., siendo capaces de este modo de unirse a una, dos, tres, four, cinco, seis o más moléculas. Como se muestra en la **Figura 35**, estos dos atributos de DARTS pueden combinarse, por ejemplo para producir anticuerpos biespecíficos que son tetravalentes, etc.

[00499] Un avance es el desarrollo de un DART que tiene afinidad por un receptor inmunológico prototípico, huCD32B, así como también afinidad por un hapteno, fluoresceína. Este DART, denominado “2B6/4420,” sirve como adaptador universal, capaz de co-ligarse a huCD32B con moléculas que interactúan con conjugado con pares de unión a fluoresceína. CD32B es un receptor de Fc que tiene la capacidad de desactivar señales en virtud de la formación de familia génica con complejos inmunes de señalización por activación En su implementación inicial, esta tecnología permite la rápida selección de varios blancos biológicos para agrupar con huCD32B sin la necesidad de generar nuevas construcciones DART construcciones. El 2B6/4420 puede simplemente mezclarse con anticuerpo fluoresceinado contra un receptor de la superficie celular y por lo tanto imitar la de un DART con afinidad por ese receptor **(FIG. 20)**. Además, este reactivo permite la unión de reactivos por afinidad que no se expresan o se producen fácilmente, permitiendo que uno supre las limitaciones técnicas. Los DART que contienen 2B6/4420 son claramente útiles como herramientas de investigación y también como candidatos clínicos. 2B6/4420 producido a partir de células HEK293 puede unirse en forma simultánea a CD32B y fluoresceína en un

ensayo ELISA. En forma adicional, puede inhibir la proliferación celular al reclutar CD32B al complejo BCR por medio de co-ligación con CD79. La rama 2B6 del DART puede reemplazarse con un a secuencia de anticuerpo diferente o una secuencia de unión que tiene otra especificidad relevante.

Materiales y métodos:

[00500] ***Construcciones de plásmidos*****:** 2B6/4420 deriva de secuencias de 2B6 MAb humanizado (hu2B6, MGA321) y una versión de Fc humano/Fv de ratón quimérico del MAb anti-fluoresceína, 4420. El DART completamente armado consiste en dos polipéptidos, lo que produce ligadura covalente de dos regiones de Fv. El primer polipéptido consiste en una secuencia de señal de secreción de hu2B6VL producido como una proteína de fusión con 4420VH separado por una ligadura que consiste en los residuos de aminoácidos GGGSGGGG. La secuencia FNRGEC, derivada del extremo terminal C de la cadena liviana kappa, se anexa al extremo terminal C de este polipéptido. El otro polipéptido consiste en la secuencia de señal -4420VL-GGGSGGGG-hu2B6VH, con la secuencia VEPKSC, derivada del fragmento Fd del extremo terminal C de la IgG1 humana, anexado al extremo terminal C. Las cisteínas en las dos cadenas forman una unión de disulfuro, que une en forma covalente los dos polipéptidos juntos **(FIG. 20)**. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos descritos se amplificaron por PCR a partir de plásmidos existentes, combinados por PCR por superposición y clonados en pCIneo (Promega) entre los sitios Nhe I y EcoR I. Finalmente, un DART con afinidad por huCD32B y huCD16 (2B6/3G8) que se ha construido previamente con el uso de métodos similares a los que se describió con anterioridad, se usó como control.

[00501] ***Anticuerpos*****:** Los anticuerpos monoclonales de murino anti-humanos CD79b, CB3.1 y CB3.2 (hibridomas) se obtuvieron de Dr. Cooper MD, University of Alabama en Birmingham, Birmingham AL. CB3.1 y CB3.2 se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford IL). El fragmento F(ab')2 de un IgG (GAM) anti-ratón de cabra, específica del fragmento Fc, (GAM) se obtuvo de Jackson Laboratories (West Grove, PA). El MAb Anti-huCD32B de ratón, 3H7, se produjo y se purificó en el laboratorio. El anti-2B6Fv de cabra fue producido por inmunización de cabras con anticuerpo completo hu2B6 y purificación por afinidad contra la región Fv de hu2B6. Las IgG HuIgG, FITC-huIgG, y HRP-anti-ratón se obtuvieron de Jackson Immunoresearch. La HRP-anti-cabra se obtuvo de Southern Biotech.

[00502] ***Expresión de DART*****:** Los plásmidos que codifican cada cadena se co-transfectaron en células 293H (Invitrogen) con el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína secretada se cosechó 3-4 en intervalos de 3 días y se purificó por cromatografía líquida contra una forma soluble inmovilizada de CD32B.

[00503] ***ELISA*****:** los DARTs 2B6/4420 o 2B6/3G8 se captuaron en placas MaxiSorp plates (Nalge Nunc) recubiertas con proteína S marcada con FITC (Novagen), IgG humana, o FITC-huIgG. La detección procedió por unión de un ectodominio CD32B soluble, seguido de 3H7

(un anticuerpo monoclonal de ratón específica para CD32B), y finalmente anti-ratón-HRP. En forma alternativa, la detección se realizó por recubrimiento de antisuero purificado por afinidad policlonal Fv anti-2B6 de cabra seguido de anti-cabra-HRP. La actividad de HRP se detectó con el uso de un sustrato colorimétrico de TMB (BioFX) y se leyó sobre un lector de placas VersaMax para ELISA.

[00504] ***Ensayo de Purificación y Proliferación de Células B*****:** Se separaron células mononuclearse de sangre periférica por un método gradiente Ficoll/Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK) con el uso de sangre de donantes sanos. Se aislaron linfocitos B con el uso del Dynal B Cell Negative Isolation Kit (Dynal Biotechnology Inc., NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las células B aisladas ($CD20^+$) fue de más del 90% según se estimó por análisis FACS. Para el ensayo de proliferación, las células B purificadas se sembraron en medio RPMI 1640 completo en placas de microtitulación de 96 pocillos de base plana a una densidad celular de $1x10^5$ células por pocillo en un volumen final de 200 μl y se incubaron durante 48 hrs en presencia o ausencia de los anticuerpos y diacuerpos a 37°C en 5% CO_2. 1 μCi/pocillo de [^{3}H]timidina (Perkin Elmer, Wellesley, MA) se agregó luego y la incubación continuó durante un adicional de 16-18h antes de cosechar. La incorporación de [^{3}H]timidina se midió por recuento de centelleo líquido.

Resultadoss

[00505] Con el fin de demostrar que 2B6/4420 DART era activo y específico, se condujeron dos experimentos ELISA. Primero, 2B6/4420 o 2B6/3G8 (como control negativo) se unió a una proteína conjugada con fluoresceína (proteína S) que se había recubierto sobre placas de ELISA. A continuación, la rama de 2B6 del DART se complementó con CD32B soluble. La unión se detectó con otro anticuerpo a CD32B con un epítope que no superpone el de 2B6 seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Mientras que 2B6/4420 DART es capaz de unirse simultáneamente a fluoresceína y CD32B, 2B6/3G8 no lo es **(FIG 21, Panel A)**. Cuando los DARTs se capturan en placas recubiertas con CD32B soluble y se detecta la unión por un anticuerpo específico para hu2B6 Fv, ambos DARTS muestran buena unión. Para demostrar que el DART 2B6/4420 era capaz de unirse a la fluoresceína conjugada con IgG humana (dado que este es el contexto de la implementación inicial de este reactivo), HuIgG, no marcado o marcado con fluoresceína, se unió a placas de ELISA y se usó para capturar 2B6/4420. Nuevamente, 2B6/3G8 se usó como control negativo. Se detectó la unión con el uso de un anticuerpo específico para Hu2B6 Fv. El DART 2B6/4420 claramente se une a FITC-HuIgG, pero no se une a HuIgG no marcado, lo que demuestra que este DART es capaz de unirse a la fluoresceína conjugada con un anticuerpo y que no hay unión significativa al anticuerpo solo. Como se esperó, no se detectó unión por DART 2B6/3G8 en cualquiera de los contextos.

[00506] Los experimentos se condujeron para demostrar que el DART 2B6/4420 era capaz de funcionar como reactivo de afinidad dual que podría tener un efecto sobre la señalización

en el contexto de un ensayo basado en células. La co-agregación de CD32B con con el BCR ha demostrado que inhibe la activación de células B. Se exploró la capacidad de el DART 2B6/4420 para co-encastrar CD32B con el BCR recubierto con αCD79b anticuerpos marcados con fluoresceína y desencadenar la inhibición de proliferación celular. Las células B se seleccionaron negativamente de sangre humana y se activa a través del tratamiento con concentraciones crecientes de anti-human-CD79b FITC-marcado de ratón, clones CB3.1 y CB3.2, y por el agregado de un fragmento $F(ab')_2$ de un GAM específico de Fc GAM como reactivo secundario para entrecruzar el BCR, junto con una concentración fija (5 μg/mL) de 2B6/4420 DART o una cantidad equivalente de 2B6/3G8 DART, una molécula que no apunta a la fluoresceína, usada de este modo como control**.** La proliferación celular, medida como incorporación de [^{3}H]-timidina, aumentada con concentraciones crecientes del activador monoclonal anti-CD79b-FITC en ausencia de DARTS o en la presencia del DART de control 2B6/3G8. La presencia de DART 2B6/4420 condujo a una reducción profunda en la proliferación de células B en todas las concentraciones de CD79b-FITC anti-humano **(FIG 22, Paneles A y B and FIG. 23, Panel A).**

[00507] La inhibición de la proliferación no se observó cuando las células B recubiertas con CB3.2 no marcado y activadas con el uso de las mismas condiciones experimentales se trataron con 2B6/4420 DART que demuestra su especificidad de destino **(FIG. 23, Panel B)**. Estos datos demuestran que el DART 2B6/4420 es capaz de entrecruzarse con CD32B y el BCR y administrar una señal inhibidora capaz de bloquear la activación celular inducida por el receptor antigénico.

6.6 DART INMUNOTERAPÉUTICO CONTRA CD32B QUE EXPRESA ENFERMEDADES DE LAS CÉLULAS B

[00508] En forma concurrente, las enfermedades de células B se tratan con el uso de anticuerpo anti-CD20Rituxan®. Algunas enfermedades de las células B, sin embargo no expresan CD20 o se tornan resistentes a Rituxan. Los DARTs de la presente invención proveen un agente inmunoterapéutico alternativo capaz de superar los problemas asociados con anticuerpo anti-CD20Rituxan®.

[00509] MGD261 es una molécula de redireccionamiento de afinidad dual (DART) que se une a hCD32B (a través del anticuerpo h2B6) y hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

[00510] La eficacia (depleción de células B) y seguridad de MGD261 se analizó en mCD32-/- hCD16A+ C57Bl/6, mCD32-/- hCD32B+ C57Bl/6 y mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ C57Bl/6. En este experimento de dosis reiteradas, se administró a los ratones 6 inyecciones IV (dos veces por semana durante 3 semanas). La depleción de células B se monitoreó por FACS. La seguridad se monitoreó por observación junto a la jaula.

[00511] Los datos indican que MGD261 es capaz de eliminar células B en ratones doble transgénicos sin inducir ningún efecto colateral significativo.

[00512] ***Datos*****:** Los ratones mCD32-/- hCD16A+ C57Bl/6, mCD32-/- hCD32B+ C57Bl/6 y mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+ C57Bl/6 de la colonia de reproducción MacroGenics recibieron dosis IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 con MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10mg/kg). Se tomaron muestras de sangre en los días -19 (antes del sangrado), 4, 11, 18, 25 y 32 para análisis de FACS. Se registró la salud y la actividad del animal tres veces por semana.

Diseño**:**

Grupo	**Animales**		**Artículo de Prueba**	**Dosis (mg/kg)**
	#	**Ratones**		
A	4	mCD32-/- hCD16A+	hE16	10
B	5	mCD32-/- hCD16A+	MGD261	10
C	3	mCD32-/- hCD32B+	hE16	10
D	3	mCD32-/- hCD32B+	MGD261	10
E	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	hE16	10
F	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	10
G	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	3
H	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	1
I	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	0,3

[00513] ***Método de análisis FACS*****:** Se recolectaron muestras de sangre completa a los 18 días antes de la administración de h2B6-h3G8 y 4, 11, 18, 25 y 32 días después del tratamiento. Las muestras de sangre se analizaron para determinar el efecto de h2B6-h3G8 sobre los recuentos de células B por un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavar se usó para recuento de células B, células T y pMN por medio del uso de perlas FlowCount, obtenidas de Beckman Coulter. El panel de los anticuerpos usados en el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para células T, CD19-APC para células B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

[00514] Los ratones tratados con hE16 o MGD261 (a cualquier concentración) no mostraron ningún signo de malestar en ningún momento durante el tiempo que duró la experimentación.

[00515] Se observó depleción de células B en ratones doble transgénicos hCD16A y hCD32B. El diacuerpo h2B6-3G8 se une a células efectoras que expresan hCD16A y hCD32B que expresa células B; los encastres se requirieron para la matanza de células B. La depleción de células B no se observó en ratones transgénicos simples **(FIG. 24)**. No hubo cambios significativos para el nivel de células T y pMN durante el estudio.

[00516] Como se demostró en forma adicional en los inmunoterapéuticos alternativos de la presente invención, un sustituto de MGD261, llamado “2,4G2-3G8 DB,” se construyó. 2,4G2-3G8 DB es una molécula de redireccionamiento de afinidad dual (DART) que se une a mCD32B (a través del anticuerpo 2,4G2) y hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

[00517] La eficacia (depleción de células B) y seguridad de 2,4G2-3G8 DB se analizó en ratones mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+ C57Bl/6, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+. En este experimento de dosis repetida, los ratones recibieron 9 inyecciones IP (tres veces por semana durante 3 semanas). La depleción de células B se monitoreó por FACS. La seguridad se monitoreó por observación junto a la jaula.

[00518] Los datos indican que 2,4G2-3G8 DB es capaz de eliminar células B en ratones transgénicos hCD16 sin inducir ningún efecto colateral significativo.

[00519] ***Dato*****:** Los ratones mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+ C57Bl/6, mCD16-/- hCD16B+ y mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+ de la colonia de reproducción MacroGenics se inyectaron IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 con 2,4G2-3G8 DB (75ug/ratón), o PBS. Se tomaron muestras de sangre en los días -10 (antes del sangrado), 4, 11 y 18 para análisis de FACS. Se registró la salud y la actividad del animal tres veces por semana.

Grupo	**# of Animales**	**Dosis µg/ms**	**Artículo de Prueba**	**Vía**	**Momentos de medición de la recolección de sangre**
A	2 mCD16-/-	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
B	2 mCD16-/- 16A+ B6	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
C	2 mCD16-/- 16B+	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
D	2 mCD16-/- 16A+ 16B+	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
E	6 mCD16-/-	75	2,4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
F	6 mCD16-/- 16A+ B6	75	2,4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
G	6 mCD16-/- 16B+	75	2,4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
H	6 mCD16-/- 16A+ 16B+	75	2,4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18

[00520] ***Método de análisis FACS*****:** Se recolectaron muestras de sangre completa 10 días antes de la administración de 2,4G2-3G8 y 4, 11 y 18 días después del inicio del tratamiento. Las muestras de sangre se analizaron para determinar el efecto de 2,4G2-3G8 sobre los recuentos de células B por un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavar se usó para recuento de células B, células T y pMN por medio del uso de tubos TruCOUNT, obtenidos de BD Immunocytometry System. El panel de los anticuerpos usados en el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para células T, CD19-APC para células B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

[00521] Los ratones tratados con hE16 o 2,4G2-3G8 DB no mostraron ningún signo de malestar en ningún momento mientras duró la experimentación.

[00522] La depleción de células B se observando en mCD16-/- hCD16A+ o mCD16-/- hCD16A+ hCD16B+ pero no en ratones mCD16-/-. Estos datos indican que las células efectoras que llevan hCD16A se requirieron para la matanza de células B **(FIG. 25)**. No hubo cambios significativos para el nivel de células células T y pMN durante el estudio.

[00523] ***Modelo Intravenoso (IV)*****:** La actividad anti-tumoral de MGD261 se analizó con el uso de un modelo intravenoso (IV) de la línea celular RAJI de tumor humano. Raji es una línea celular de linfoma de Burkitt humano que expresa hCD32B. Cuando se inyecta por vía intravenosa en ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-, las células tumorales se ubcan en la médula y producen parálisis de la pata trasera.

[00524] Los datos indican que MGD261 es capaz de bloquear el crecimiento de células tumorales Raji in vivo en ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/-. Los datos indican que MGD261 puede usarse en el tratamiento de CD32B expressing enfermedades de las células B en el humano.

[00525] ***Datos*****:** Ratones mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- C57Bl/6 de doce-veinte semanas de vida de la colonia de reproducción MacroGenics se inyectaron IV el día 0 con $5x10^6$ células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también recibieron tratamiento por vía intraperitoneana (IP) con 250, 25 o 2,5ug MGD261 o con PBS (control negativo). Los ratones se observaron todos los días y el peso del cuerpo se registró dos veces por semana. Los ratones que desarrollaron parálisis de las patas posteriores se sacrificaron.

[00526] ***Resultados*****:** Los ratones tratados con PBS murieron entre el día 25 y el día 50. Los ratones tratados con con MGD261 sobrevivieron por lo menos hasta el día 90 **(FIG. 26)**. El aumento de la supervivencia es estadísticamente significativo. Una comparación de las curvas de suprvivencia con el uso de un Test de Logrank dio u χ^2 of 96,46 (df 9; valor P < 0,0001).

6.7 EXPRESIÓN DE DART EN PROCARIOTAS

[00527] Se condujeron experimentos para demostrar la capacidad para producir DARTs en huéspedes no mamíferos. De acuerdo con lo anterior, la *Escherichia coli* se transformó con un plásmido que expresa DART, y la expresión de DART se monitoreó.

Materiales y métodos:

[00528] ***Construcción de plásmidos*****:** 3G8 es un anticuerpo humanizado monoclonal contra HuCD16. El DART descrito aquí consiste en dos cadena ligadas en forma covalente, cada una de las cuales tiene un VL seguido de un separador, luego un VH seguido de un Cys en un buen contexto para formar una unión de disulfuro a la cadena opuesta. La secuencia DART que codifica 3G8VL-GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly (**SEC ID NRO.: 10**)-3G8VH-LeuGlyGlyCys se amplificó por PCR a partir de una construcción eucariótica existente y se digirió con Nco I y EcoR I. El vector de destino fue pET25b (+) (Novagen), que contiene una secuencia líder *pelB* para secreción en *E. coli*. Antes de la inserción of las secuencias DART 3G8/3G8, el vector se modificó como sigue: Primero, el promotor T7 se reemplazó por el promotor de menor actividad *lac* con el fin de favorecer la expresión soluble, aunque de nivel inferior de las proteínas bajo su control. En forma adicional, se introdujeron dos mutaciones puntuales para eliminar dos internal codones Met presentes en el comienzo del sitio de clonación múltiple (MCS) con el fin de favorecer el inicio del Met presente en el comienzo

del *pelB* líder. El DART que se produce por esta construcción consiste en dos ramas de la región V que tienen la misma especificidad, es decir HuCD16.

[00529] ***Expresión*****:** Células BL21DE3 (Novagen) se transformaron con el plásmido pET25b(+) *T7-lac*+ 3G8/3G8 de una colonia resistente a amp se usó para sembrar el cutivo del caldo. Cuando el cultivo alcanzó 0,5 OD600 unidades, 0,5mM IPTG se agregó para inducir la expresión. El cultivo se desarrolló a 30°C durante 2 horas y se recolectó el medio libre de células.

[00530] ***Purificación*****:** El DART 3G8/3G8 se purificó en un proceso de dos pasos utilizando cromatografía por exclusión de tamaño y afinidad. El DART se capturó del medio acondicionado con el uso de cromatografía por afinidad. Específicamente, CD16A acoplado a Sepharose 4B activada con CNBr (GE Healthcare). La resina CD16A-Sepharose se equilibró en 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 antes de cargar. Luego de la compleción de la carga, la resina se lavó con buffer de equilibrio antes de la elución del DART unido con 50 mM Glicina pH 3,0. El DART eluyente se neutralizó inmediatamente con 1M Tris/HCl pH 8,0 y se concentró con el uso de un concentrador del tipo centrifugado (Vivaspin 20, 10k MWCO PES, VivaScience Inc.). El DART concentrado se purificó en forma adicional por cromatografía por exlcusión de tamaño con el uso de una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS.

Resultados

[00531] 1,7 litros de medio acondicionado cultivado de E coli se procesó a través de la columna CD16A. El rendimiento de DART fue 0,12 mg. El análisis del DART purificado por SDS-PAGE y SEC demostró comparabilidad con el DART de control expresado en células de mamíferos (CHO) **(FIG. 27)**.

[00532] ***ELISA de unión de DART h3G8-h3G8 exprsado en E.coli*****:** La expresión de DART h3G8-h3G8 en *E.coli* se midió con el uso de an ELISA. 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de anticuerpo anti-h3G8 específico de Fv 2C11 se recubrió en placa Maxisorp de 96 pocillos en buffer de carbonato a 4°C hasta la mañana siguiente. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, 0,1% Tween 20) y luego se bloqueó por 0,5% BSA en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de agregar DART de prueba. Durante el bloqueo, *E.*coli expresó DART h3G8-h3G8, DART h2B6-h3G8, y DART h2B6-h2B6 (control negativo) diluidos en 1 µg/ml, y 0,3 µg/ml en PBST/BSA. 50 µl/pocillo de DARTs diluidos se agregaron a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado con PBS-T tres veces, 50 µl/pocillo de 0,1 µg/ml de fusión sCD16-Fc biotinilada se agregó a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado con PBS-T tres veces, 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de Estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) se usó para detección y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se desarrolló con el uso de 80 ul/pocillo de sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se interrumpió por 40 µl/pocillo de 1% H_2SO_4. El OD450 nm se leyó por medio del uso de un

lector de placas de 96 pocillos y software SOFT max. La lectura obtenida se graficó con el uso de software GraphPadPrism 3.03 (**FIG. 28**).

6.8 MUERTE DE CÉLULAS B HUMANAS INDUCIDAS POR DART

[00533] Se incubaron PBMC humanas durante la noche con: CD16-CD32B – hu3G8-hu2b6 (se describió con anterioridad); ch2B6-aglyc – anticuerpo aglicosilado quimérico 2B6 (descrito en la Solicitud de Patente de EE UU con Nro. de Serie presentada junto con esta 11/108,135, publicada como US2005/0260213, incorporada en este documento a modo de referencia) y CD16-CD79. El ADN y las secuencias de proteína codificadas de CD16-CD79 son como sigue:

H3G8VL-CB3.1VH

[00534] Secuencia de nucleótidos (SEC ID NRO.: 226):

```
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga       50
gagggccacc atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg      100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc      150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct ggggtcccag acaggtttag      200
tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc agcctgcagg      250
ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg      350
cggaggccag gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg      400
gggcttcagt gaagctgtcc tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc      450
tactggatga actgggtgaa gcagaggcct ggacaaggcc ttgaatggat      500
tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat caaatgttca      550
aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg      600
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag      650
agctatgggc tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg      700
agcccaaatc ttgt                                             714
```

[00535] Secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 227):

```
DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL       50
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY      100
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLQQPGAEL VRPGASVKLS CKASGYTFTS      150
YWMNWVKQRP GQGLEWIGMV DPSDSETHYN QMFKDKATLT VDKSSSTAYM      200
QLSSLTSEDS AVYYCARAMG YWGQGTSVTV SSVEPKSC                   238
```

CB3.1VL-h3G8VH

[00536] Secuencia de nucleótidos (SEC ID NRO.: 228):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca       50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg      100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac      150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt      200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg      250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc      400
ccacacagac cctcacactg acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc      450
```

```
acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt cagcctcccg ggaaggctct      500
agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc tataatccag      550
ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta      600
gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg      650
tgctcaaata aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg      700
tcactgtgag ctcattcaac aggggagagt gt                        732
```

[00537] Secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 229):

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP      100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS      150
TSGMGVGWIR QPPGKALEWL AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV      200
VLTMTNMDPV DTATYYCAQI NPAWFAYWGQ GTLVTVSSFN RGEC            244
```

[00538] Se analizó la apoptosis por análisis FACS como porcentaje de población de PI+Annexin-V+ de células B (Células CD20+) sobre el total de la población FSC/SSC sin compuertas (**FIG. 29**).

6.9 DART 8B5-CB3.1

8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

[00539] 8B5VL se amplificó por medio del uso de H9 y Lgh630R como cebadores, ch8B5Lc como patrón. CB3.1VH se amplificó por medio del uso de lgh628F y Lgh629R como cebadores, ch8B5Hc como patrón. La secuencia de ligadura se incorporó en los cebadores lgh630R y Lgh628F. La ligadura del extremo terminal C y el codón de detención se incorporó en cebador lgh629R. Los productos de PCR se purificaron con gel y se mezclaron juntos en igual proporción, luego se amplificaron por medio del uso de H9 y Lgh629R como cebadores. El producto de PCR superpuesto se digirió luego con NheI/EcoRI endonucleasas de restricción, y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC

[00540] CB3.1VL se amplificó por medio del uso de H9 y Lgh630R, que compartió la misma secuencia que 8B5VL en FR4, como cebadores, y chCB3.1Lc como patrón. 8B5VH se amplificó por medio del uso de lgh631F y Lgh640R como cebadores, y ch8B5Hc como patrón. La secuencia de ligadura se incorporó en los cebadores lgh630R y Lgh631F. La ligadura del extremo terminal C y el codón de detención se incorporó en el cebador lgh640R. Los productos de PCR se purificaron con gel y se mezclaron juntos en igual proporción, luego se amplificaron por medio del uso de H9 y Lgh640R como cebadores. El producto de PCR superpuesto se digirió luego con NheI/EcoRI endonucleasas de restricción, y se clonó en el vector pCIneo.

Marca Anti-Flag -8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

[00541] La arca Anti-Flag se insertó entre la secuencia de señal y 8B5VL por PCR por superposición. La secuencia de señal y la marca Flag se amplificó por medio del uso de H9 y Lgh647R como cebadores y ch8B5Lc como patrón. 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC se re-amplificó por medio del uso de lgh647F y Lgh629R como cebadores y 8B5VL-CB3.1VH-

VEPKSC como patrón. Los productos de PCR se purificaron con gel y se mezclaron juntos en igual proporción, luego se amplificaron por medio del uso de H9 y Lgh629R como cebadores. El producto de PCR superpuesto se digirió luego con NheI/EcoRI endonucleasas de restricción, y se clonó en el vector pCIneo.

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

[00542] Para generar una ligadura diferente de extremo terminal C en la construcción 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC, la construcción se re-amplificó por medio del uso de H9 y Lgh646R como cebadores. La ligadura de extremo terminal C LGGC se integró en el cebador lgh646R. El producto por PCR se digirió luego con NheI/EcoRI endonucleasas de restricción, y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-LGGC

[00543] La misma estrategia se usó para crear CB3.1VL-8B5VH-LGGC. La ligadura de extremo terminal C LGGC se integró en cebado lgh648R y CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC se usó como patrón. El producto por PCR se digirió luego con NheI/EcoRI endonucleasas de restricción, y se clonó en el vector pCIneo.

Marca Anti-Flag -8B5VL-CB3.1VH-LGGC

[00544] La misma estrategia se usó también para crear Marca Anti-Flag -8B5VL-CB3.1VH-LGGC. La ligadura de extremo terminal C LGGC se integró en cebador lgh648R y la Marca Anti-Flag -8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC se usó como patrón. El producto por PCR se digirió luego con NheI/EcoRI endonucleasas de restricción, y se clonó en el vector pCIneo.

[00545] 8B5-CB3.1-VEPKSC Secuencia de nucleótidos (SEC ID NRO.: 230):

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga       50
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg      250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga      400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca      550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc      600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta      650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt      700
gt                                                          702
```

[00546] 8B5-CB3.1-VEPKSC Secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 231):

```
DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA       50
ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA      100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN      150
```

WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS 200
LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSVE PKSC 234

[00547] CB3.1-8B5-FNRGEC Secuencia de nucleótidos (SEC ID NRO.: 232):

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca 50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg 100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac 150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt 200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg 350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt 450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg 500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta 650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag 700
tctcctcgtt caacagggga gagtgt 726

[00548] CB3.1-8B5-FNRGEC Secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 233):

DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN 50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP 100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS 150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS 200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSFNRG EC 242

[00549] 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

[00550] 8B5VL se amplificó por medio del uso de H9 y Lgh694R como cebadores, ch8B5Lc como patrón. 8B5VH se amplificó por medio del uso de lgh695F y Lgh696R como cebadores, ch8B5Hc como patrón. La secuencia de ligadura se incorporó en los cebadores lgh694R y Lgh695F. HuIgG1Fc se amplificó por medio del uso de lgh355F y Lgh366R como cebadores, ch8B5Hc como patrón. Los productos de PCR se purificaron con gel y se mezclaron juntos en igual proporción, luego se amplificaron por medio del uso de H9 y Lgh366R como cebadores. El producto de PCR superpuesto se digirió luego con NheI/EcoRI endonucleasas de restricción, y se clonó en el vector pCIneo.

[00551] 8B5VL-CB3.1VH-LGGC Secuencia de nucleótidos (SEC ID NRO.: 234):

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga 50
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc 150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc 200
tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg 250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga 400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac 450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga 500

tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca 550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta 650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

[00552] 8B5VL-CB3.1VH-LGGC Secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 235):

DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA 50
ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA 100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN 150
WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS 200
LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSLG GC 232

[00553] CB3.1-8B5-LGGC Secuencia de nucleótidos (SEC ID NRO.: 236):

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca 50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg 100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac 150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt 200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg 350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt 450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg 500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta 650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag 700
tctcctcgct gggaggctgc 720

[00554] CB3.1-8B5-LGGC Secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 237):

DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN 50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP 100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS 150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS 200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSLGGC 240

[00555] Cebadores:

Lgh628F (**SEC ID NRO.: 238):**

ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

Lgh629R (**SEC ID NRO.: 239):**

tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

Lgh630R (**SEC ID NRO.: 240):**

gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

Lgh631F (**SEC ID NRO.: 241):**

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

Lgh640R (**SEC ID NRO.: 242):**

tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

Lgh644R (**SEC ID NRO.: 243):**

tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

Lgh646R (**SEC ID NRO.: 244):**

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

Lgh647F (**SEC ID NRO.: 245):**

caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

Lgh648R (**SEC ID NRO.: 246):**

tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

[00556] ***Expresión:*** La construcción 5 y 6, o 6 y 7, o 8 y 9, o 9 y 10, que codificó los plásmidos de expresión **(FIG. 30)** se co-transfectaron en células HEK-293 para expresar 8B5-CB3.1 DART con o sin marca anti bandera con el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El medio acondicionado se cosechó en cada tres días durante tres veces. El medio acondicionado se purificó a continuación con el uso de columna por afinidad CD32B.

[00557] ***ELISA*:** Los ELISA se condujeron de la siguiente manera: 50 µl/pocillo de 2 ug/ml de CD32B-Fc se recubrió en placa Maxisorp de 96 pocillos en buffer de carbonato a 4°C hasta la mañana siguiente. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, 0,1% Tween 20) y luego se bloqueó por 0,5% BSA en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes agregar proteína de fusión Fc de cadena simple de prueba. Durante el bloqueo, 8B5-CB3.1 DART se diluyó en una dilución serial de dos partes comenzando con 2 µg/ml. 25 µl/pocillo de DART diluido mezclado con 25 µl/pocillo de 50 ng/ml ch8B5 se transfirió de la placa de dilución a la placa de ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado con PBS-T tres veces, 50 µl/pocillo de 1:10.000 $F(ab')_2$ de cabra anti humano IgG $F(ab')_2$ diluído conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) se agregó a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo de sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se interrumpió por 40 µl/pocillo de 1% H_2SO_4. El OD450 nm se leyó con el uso de un lector de placas de 96 pocillos y software SOFT max. La lectura obtenida se graficó con el uso de software GraphPadPrism 3.03 **(FIG. 31).**

6.10 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DART TETRAVALENTE CON ESTRUCTURA DE Ig

[00558] Cuatro cadenas de polipéptidos se emplearon para producir una especie de DART con estructura de Ig que tiene sitios de unión al antígeno tetravalentes **(Figura 32; Figura 33)**. La especie DART con estructura de Ig tiene propiedades únicas, ya que sus dominios pueden diseñarse para unirse al mismo epítope (para formar a DART con estructura Ig específicos, mono epítope, tetravalentes capaces de unir cuatro moléculas de antígeno idénticas), o a antígenos o epítopes diferentes Por ejemplo, sus dominios pueden diseñarse para unirse a dos epítopes del mismo antígeno (con el objetivo de formar un DART con estructura de Ig específico bi-epítope, específico mono-antígeno, tetravalente), o a epítopes de diferentes moléculas de antígeno con el objetivo de formar un DART tetravalente con

estructura de Ig que tiene un par de sitios de unión específicos para un primer antígeno y un segundo par of sitios de unión específicos para un segundo antígeno). Las moléculas híbridas que tienen combinaciones de dichos atributos pueden producirse fácilmente.

[00559] Para ilustrar las características de dicha especie DART con estructura de Ig, una especie DART con estructura de Ig ejemplificativa tetravalente se produjo que tiene un par de sitios de unión específicos para CD32 y un segundo de sitios de unión específicos de CD16A. Esta especie DART con estructura de Ig se produjo con el uso de las siguientes cuatro cadenas de polipéptidos:

[00560] 2,4G2-3G8-hKappa Secuencia de nucleótidos

(**SEC ID NRO.: 247)**:

```
gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga      50
aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag      100
cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat      150
gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc      200
tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg      250
gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct      300
gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca      400
gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt      450
gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca      500
catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac      550
tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc      600
agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc      650
cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac      700
tgggaggctg cggcggaggg agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc      750
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt      800
gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg      850
tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag      900
gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa      950
agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg     1000
gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt           1044
```

[00561] 2,4G2-3G8-hKappa Secuencia de aminoácidos codificada

(**SEC ID NRO.: 248)**:

```
DVQMTQSPSN LAASPGESVS INCKASESIS KYLAWYLQKP GKANKLLMYD       50
GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTIRSLEP EDFGLYYCQQ HYEYPATFGS      100
GTKLEIKGGG SGGGGQVTLK ESGPGILQPS QTLSLTCSFS GFSLRTSGMG      150
VGWIRQPSGK GLEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SSNQVFLKIA      200
SVDTADTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSLGGCGGG SRTVAAPSVF      250
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ      300
DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC        350
```

[00562] 3G8-2,4G2-hG1 Secuencia de nucleótidos

(**SEC ID NRO.: 249)**:

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca      50
```

```
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg      100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc      150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag      200
tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg      250
aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg      350
cggaggcgag gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg      400
gaaggtccct gaaactctcg tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac      450
tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca acgacgggtc tggagtgggt      500
cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga gactccgtga      550
agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg      600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac      650
agagactacg ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag      700
tttcagtcac tgtctcctca ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc      750
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc      800
tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac      850
cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc      900
ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt      950
gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga     1000
atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct     1050
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg     1100
gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga     1150
tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa     1200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa     1250
tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg     1300
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac     1350
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat     1400
ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc     1450
catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc     1500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca     1550
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct     1600
ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1650
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta     1700
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa                      1734
```

[00563] 3G8-2,4G2-hG1 Secuencia de aminoácidos codificada (SEC ID NRO.: 250):

```
DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL       50
LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQQSNEDPY      100
TFGGGTKLEI KGGGSGGGGE VELVESGGGL VQPGRSLKLS CAASGFTFSD      150
YYMAWVRQAP TTGLEWVASI SYDGGDTHYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL      200
QMDSLRSEDT ATYYCATETT GIPTGVMDAW GQGVSVTVSS LGGCGGGSAS      250
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT      300
FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS      350
CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE      400
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY      450
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV      500
```

KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 550
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 578

[00564] Las preparaciones de ls moléculas DART con estructura de Ig que tienen las secuencias anteriores se obtuvieron de diferentes aislados de plásmidos y se denominaron “Ig DART 1” y “Ig DART 2.” La capacidad de estas especies DART con estructura de Ig de unirse a mCD32-hCD16A en un ELISA se comparó con la del medio solo, un DART que tiene un único sitio de unión CD32 y uno CD16A (“DART”), y control anti-ch-mCD32 mAb **(Figura 34)**. El DART con estructura de Ig de la presente invención se encontró que tiene mucho mayor afinidad de unión al antígeno que cualquiera de DART o el anticuerpo de control.

6.11 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2

[00565] Los genes que codifican CD79VL-CD32BVH (Secuencia 1), CD32BVL-CD79VH-1 (Secuencia 2), y CD32BVL-CD79VH-2 (Secuencia 3) se clonaron en el vector de expresión pEE13 lo que produce construcciones de expresión 1, 2, y 3 respectivamente. El plásmido de expresión de la construcción 1 se co-transfectó junto con el plásmido de expresión 2 o 3 en células HEK-293 para hacer diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2, respectivamente. El medio acondicionado se cosechó en cada tres días durante tres veces. El medio acondicionado se purificó a continuación con el uso de columna por afinidad CD32B.

[00566] Los ELISA se condujeron de la siguiente manera: 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de CD32B-Fc se recubrió en placa Maxisorp de 96 pocillos en buffer de carbonato a 4° C hasta la mañana siguiente. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, 0,1% Tween 20) y luego se bloqueó por 0,5% BSA en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes agregar proteína de fusión Fc de cadena simple de prueba. Durante el bloqueo, el diacuerpo específico CD32B-CD79-1 o CD32B-CD79-2 se diluyó en una dilución serial de dos partes comenzando con 2 µg/ml. 25 µl/pocillo de diacuerpo biespecífico diluido se mezcló con 25 µl/pocillo de 50 ng/ml de anticuerpo anti-CD32B y se agregan a una placa de ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado con PBS-T tres veces, 50 µl/pocillo de 1:10.000 diluído conjugado con HRP $F(ab')_2$ IgG anti humana de cabra $F(ab')_2$ (Jackson ImmunoResearch) se agregó a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo de sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se interrumpió por 40 µl/pocillo de 1% H_2SO_4. El OD450 nm se leyó con el uso de un lector de placas de 96 pocillos y software SOFT max. La lectura obtenida se graficó con el uso de software GraphPadPrism 3.03. El experimento reveló que los diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2 fueron capaces de unión inmunoespecífica a CD32-Fc con una afinidad equivalente a la del anticuerpo anti-CD32B control. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificadas de las construcciones descritas con anterioridad se proporcionan a continuación:

[00567] Secuencia 1 - CD79VL-CD32BVH secuencia de nucleótidos

(**SEC ID NRO.: 251**):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca       50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg      100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac      150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt      200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg      250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt      600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag      700
tctcctcgct gggaggctgc                                       720
```

[00568] Secuencia 2 - CD79VL-CD32BVH secuencia de aminoácidos

(**SEC ID NRO.: 252**):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP      100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS      150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS      200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC                 240
```

[00569] Sequence 3 – CD32BVL-CD79VH-1 secuencia de nucleótidos

(**SEC ID NRO.: 253**):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga       50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg      250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg      300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga      400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca      550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc      600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta      650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc          696
```

[00570] Secuencia 4 – CD32BVL-CD79VH-1 secuencia de aminoácidos

(**SEC ID NRO.: 254**):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA       50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG      100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN      150
```

WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC 232

[00571] Secuencia 5 – CD32BVL-CD79VH-2 secuencia de nucleótidos (**SEC ID NRO.: 255**):

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga 50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa 100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc 150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc 200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg 250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt 350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga 400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac 450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga 500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca 550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta 650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

[00572] Secuencia 6 – CD32BVL-CD79VH-2 secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO.: 256**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA 50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG 100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN 150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC 232

6,12 CONSTRUCCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE DIACUERPOS BI-FUNCIONALES H8B5-HBCRC

[00573] Se construyó un diacuerpo que contiene regiones variables de unirse a CD32 ycomplejo receptor de células B (“BCRC”).

[00574] Clonación. Las construcciones se construyeron con el uso de PCR/PCR por superposición estándar:

h8B5VL-G3SG4-hBCRCVH M48I-**LGGC:**

Un VL 8B5 totalmente humanizado (que reconoce CD32) se amplificó por medio del uso de lgh321F y Lgh788R como cebadores. hBCRCVH M48I se amplificó por medio del uso de lgh784F y Lgh386R como cebadores. Los productos de PCR se purificaron con gel and mix together y se amplificaron por medio del uso de lgh321F y Lgh386R. El fragmento de PCR por superposición luego se clonó en pEE6 en el sitio XbaI-EcoRI. “G3SG4” es una ligadura que tiene la secuencia: GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**).

hBCRCVL R45N-G3SG4-h8B5VH **–LGGC**

El hBCRCVL R45N se amplificó por medio del uso de lgh321F y Lgh785R como cebadores. El h8B5VH se amplificó por medio del uso de lgh787F y Lgh786R como

cebadores. Los productos de PCR se purificaron con gel y se mezclaron juntos y se amplificaron por medio del uso de lgh321F y Lgh786R. El fragmento de PCR por superposición luego se clonó en pEE13 en el sitio XbaI-EcoRI

[00575] Construcción del vector simple. El pEE6hHBCRCVL R45N-h8B5VH se digirió en los sitios Bgl II-Sal I y un fragmento de 3,3kb se purificó y se insertó en pEE13 hHBCRCVL 45N-h8B5VH en los sitios BamHI-SalI. El Bgl II y BamH I comparten extremos cohesivos compatibles. La secuencia del DART y los cebadores usados para construir el DART se muestran a continuación:

[00576] hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC secuencia de nucleótidos (**SEC ID NRO.: 257**):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca       50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg      100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac      150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt      200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg      250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt      600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag      700
tctcctcgct gggaggctgc                                       720
```

[00577] hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO.: 258**):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP      100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS      150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS      200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC                 240
```

[00578] H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC secuencia de nucleótidos (**SEC ID NRO.: 259**):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga       50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa      100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc      150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc      200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg      250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg      300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
```

```
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga      400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac      450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga      500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca      550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc      600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta      650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc          696
```

[00579] H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO.: 260**):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA       50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG      100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS      200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                         232
```

[00580] Cebadores:

Cebador Lgh321F (**SEC ID NRO.: 261**):

```
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac            36
```

Cebador Lgh386R (**SEC ID NRO.: 262**):

```
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc   45
```

Cebador Lgh784F (**SEC ID NRO.: 263**):

```
ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag          39
```

Cebador Lgh785R (**SEC ID NRO.: 264**):

```
cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc           38
```

Cebador Lgh786R (**SEC ID NRO.: 265**):

```
tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg      42
```

Cebador Lgh787F (**SEC ID NRO.: 266**):

```
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc    44
```

[00581] El plásmido de expresión Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu2B6VH 4-**LGGC** se co-transfectó junto con Hu2B6VL 5-G3SG4- Hu3G8VH 5-**LGGC** en células HEK-293 para hacer que el diacuerpo bioespecífico Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 reconozca CD32 y CD79. En el mismo momento, Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu2B6VH 4-**LGGC** y Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu3G8VH 5-**LGGC** se transfectaron en forma individual en células HEK-293 para hacer el diacuerpo Hu2B6 4.5 y Hu3G8 5.1. Después de tres días en cultivo, los medios acondicionados se cosecharon caracterizaron por ELISA de unión. El resultado de este exerimento se muestra en la **Figura 36**.

[00582] ***Diseño experimental*:** 100 ng/pocillo de FcRIIb-G2-Agly soluble se recubrió en placa Maxisorp de 96 pocillos en buffer de carbonato a 40° C durante toda la noche. Plate se lavó tres veces con PBS/0,1% Tween20 y luego se bloqueo por 0,5% BSA en PBS/0,1%Tween 20 durnante 30 mins a temperatura ambiente antes agregar los diacuerpos. Una dilución serial a la mitad del medio acondicionado de diacuerpo bioespecífico Hu2B6

4.5-Hu3G8 5.1, diacuerpo Hu2B6 4.5, y diacuerpo Hu3G8 5.1 comenzando con 25ng/pocillo se agregó a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se lavó con PBS/0,1% Tween20 tres veces, 10ng/pocillo de FcRIIIa-G2-Biotin se agregó a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se lavó con PBS/0,1% Tween20 tres veces, 50 ul de 1:5000 dilution de Estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) se usó para detección. Luego de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó con PBS/0,1% Tween20 tres veces y se desarrolló con el uso de sustrato de TMB. Después de 10 minutos de incubación, la reacción se interrumpió por 1% H2SO4. El OD450 nm se leyó por el programa SOFTmax. La lectura obtenida se graficó con el uso de software GraphPadPrism 3.03.

6,13 CONSTRUCCIÓN DE DIACUERPOS DART Ig

[00583] Los diacuerpos DART Ig se construyeron that contain regiones variables de unirse a CD32 y complejo receptor de células B ("BCRC"). El primer diacuerpo empleó una ligadura LGGCGGGS (**SEC ID NRO.: 267**) entre las secuencias VH y las secuencias Fc de la molécula. El segundo diacuerpo empleó en forma indistinta una LEIK ligadura que tiene la secuencia: LEIK (**SEC ID NRO.: 268**) o una ligadura TVSS que tiene la secuencia TVSS (**SEC ID NRO.: 269**). Las secuencias de la cadenas de estos diacuerpos y polinucleótidos de codificación se muestran a continuación:

[00584] H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

(**SEC ID NRO.: 270**):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA       50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG      100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS      200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GCGGGSRTVA APSVFIFPPS      250
DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS      300
TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC             343
```

[00585] Las secuencias H8B5VL se fusionan a las secuencias hBCRCVH por la ligadura GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) ubicada en la posición 108-115. Las secuencias hBCRCVH se fusionan a las secuencias Fc por la ligadura LGGCGGGS (**SEC ID NRO.: 267)** ubicada en la posición 229-236 (ambas se mostraron anteriormente subrayadas). El polinucleótido que codifica la secuencia H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa es:

(**SEC ID NRO.: 271**):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga       50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
```

aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac 450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga 500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca 550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta 650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc tca**ctggga ggctgcggcg** 700
gagggagccg aactgtggct gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct 750
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa 800
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc 850
aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 900
acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa 1000
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg 1050
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 1082

donde las secuencias que codifican las ligaduras: GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) y LGGCGGGS (**SEC ID NRO.: 267)** están ubicadas en la posición 322-345 y 685-708, respectivamente (ambas se mostraron anteriormente subrayadas).

[00586] HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

(**SEC ID NRO.: 272**):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN 50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP 100
LTFGGGTKLE IK**GGGSGGGG** EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS 150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS 200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSS**LGGC GGGS**ASTKGP 250
SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 300
LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT 350
HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV 400
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV 450
SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY 500
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 550
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 574

[00587] Las secuencias hBCRCVL se fusionan a las secuencias H8B5VH por la ligadura GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) ubicada en la posición 113-120. Las H8B5VH secuencias se fusionan a las secuencias Fc por la ligadura LGGCGGGS (**SEC ID NRO.: 267)** ubicada en la posición 237-244 (ambas se mostraron anteriormente subrayadas). El polinucleótido que codifica la secuencia HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1 es:

(**SEC ID NRO.: 273**):

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca 50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac 150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt 200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg 250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa**ggag gcggatccgg** 350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac 400

ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt 450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg 500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg 550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta 650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg 700
tctccagc**ct gggaggctgc ggcggaggga gc**gcctccac caagggccca 750
tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc 800
ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt 850
cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 900
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc 950
cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca 1000
gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact 1050
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt 1100
cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc 1150
ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa 1250
gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca 1300
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1350
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa 1400
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg 1450
agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1500
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa 1550
ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct 1600
acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1650
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 1700
cctctccctg tctccgggta aa 1722

donde las secuencias que codifican las ligaduras: GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) y LGGCGGGS (**SEC ID NRO.: 267)** están ubicadas en la posición 337-360 y 709-732, respectivamente (ambas se mostraron anteriormente subrayadas).

[00588] H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

(**SEC ID NRO.: 274**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA 50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG 100
GTKVEIK**GGG SGGGG**QVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN 150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS 200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTV**LEIK**RT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 250
ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 300
TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 335

[00589] Las secuencias H8B5VL se fusionan a las secuencias HBCRCVH por la ligadura GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) located en la posición 108-115. Las secuencias HBCRCVH se fusionan a las secuencias Fc por la ligadura LEIK (**SEC ID NRO.: 268)** located en la posición 225-228 (ambas se mostraron anteriormente subrayadas). El polinucleótido que codifica la secuencia H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa es:

(**SEC ID NRO.: 275**):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga       50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac       450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga       500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca       550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta       650
ctgggggcaa gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac       700
catcggtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact       750
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt       800
acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg       850
tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg       900
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt       950
cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag      1000
agtgt                                                       1005
```

donde las secuencias que codifican las ligaduras: GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) y LEIK (**SEC ID NRO.: 268)** están ubicadas en la posición 322-345 y 673-684, respectivamente (ambas se mostraron anteriormente subrayadas).

[00590] HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1 (**SEC ID NRO.: 276**):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN       50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP      100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS      150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS      200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS      250
SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS      300
LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA      350
PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG      400
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP      450
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW      500
ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA      550
LHNHYTQKSL SLSPGK                                           566
```

[00591] Las secuencias HBCRCVL se fusionan a las secuencias h8B5VH por la ligadura GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) ubicadas en la posición 113-120. Las secuencias h8B5VH se fusionan a las secuencias Fc por la ligadura TVSS (**SEC ID NRO.: 269)** ubicadas en la posición 233-236 (ambas se mostraron anteriormente subrayadas). El polinucleótido que codifica HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 es:

(**SEC ID NRO.: 277**):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca      50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg     100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac     150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt     200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg     250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg     300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg     350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac     400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt     450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg     500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg     550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt     600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta     650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg     700
tctccagcgc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc     750
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga     800
ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca     850
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc     900
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta     950
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag    1000
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca    1050
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa    1100
ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg    1150
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc    1200
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag    1250
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga    1300
atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc    1350
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt    1400
gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc    1450
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg    1500
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct    1550
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga    1600
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct    1650
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa      1698
```

donde las secuencias que codifican las ligaduras: GGGSGGGG (**SEC ID NRO.: 10**) y TVSS (**SEC ID NRO.: 269)** están ubicadas en la posición 337-360 y 697-708, respectivamente (ambas se mostraron anteriormente subrayadas).

6,14 OPTIMIZACIÓN DE LIGADURAS

[00592] Como se discutió con anterioridad, los diacuerpos DART Ig de la presente invención con preferencia contienen ligaduras entre las secuencias VH y las secuencias Fc de la molécula. Se condujeron experimentos para optimizar las ligaduras con el fin de maixmizar el rendimiento y la actividad. Se emplearon las siguientes ligaduras.

SEC ID NRO.	Ligadura

278	FNRGECGGGS
279	FNRGECLQVYYRM
280	LEGEEG
281	LEGEEGC
282	LEIK
283	LGEEG
284	LGEEGC
285	LGGCGGGS
286	LGKKG
287	LGKKGC
288	LKGKKG
289	LKGKKGC
290	LQVYYRM
291	LQVYYRMC
292	TVSS
293	VEPKSCGGGS
294	VEPKSCYLYLRARV
295	VQVHYRM
296	VQVHYRMC
297	YLYLRARV
298	YLYLRARVC

[00593] Las ligaduras anteriores se introdujeron en los plásmidos con el fin de producir un conjunto de diacuerpos DART Ig que tienen diferentes combinaciones de ligaduras:

Plásmido pMGX	**Cadena A Ligadura SEC ID NRO.**	**pEE13,4**	**Cadena B Ligadura SEC ID NRO.**	**pEE6,4**	**ELISA (µg/ml)**	**Proteína purificada (Después de SEC) (1 litro)**
900	285	√	285	√	0,799	0,3 mg
901	283	√	286	√	0,628	0,4 mg
902	284	√	287	√	0,896	0,47 mg
903	280	√	288	√	0,557	
904	281	√	289	√	0,450	0,4 mg
905	293	√	278	√	0,360	
906	294	√	279	√	N/A	
907	282	√	292	√	N/A	
908	297	√	295	√	0,428	0,2 mg
909	297	√	290	√	0,305	0,3 mg
910	298	√	296	√	N/A	

911	298	√	291	√	0,218	

[00594] Las propiedades de agregación de los DARTS Ig producidos se determinó.

Ligaduras DART Ig	**Total Proteína (mg)**	**Oligómero %**	**Monómero %**	**Fragmento %**	**Clasificación RB**
900A/900B	0,51	12	45	43	4
901A/901B	0,72	5	83	12	1
902A/902B	0,78	21	48	31	4
903A/903B	0,5	3	84	13	1
904A/904B	0,66	16	65	26	4
905A/905B	0,5	20	60	20	3
908A/908B	0,5	13	65	17	2
908A/909B	0,38	22	50	28	3
910A/911B	0,2	45	10	45	5

[00595] Los datos mostraron inesperadamente que las construcciones que tienen ligaduras, tales como las empleadas en 901A/901B; 903A/903B; y 908A/908B dieron resultados drásticamente superiores (menos oligomerización y/o menos producción de fragmentos) que las construcciones que tienen ligaduras, tales como 910A/911B.

6,15 DARTS E-COIL / K-COIL

[00596] Como se apreciará en vista de lo que antecede, los polipéptidos individuales de un DART biespecífico pueden formar dos species de homodímeros y una especie de heterodímero. En una realización de la presente invención, un polipéptido cargado puede agregarse al extremo terminal C de uno, o con mayor preferencia, ambos polipéptidos DART. Al seleccionar los polipéptidos cargados de carga opuesta para los polipéptidos individuales del DART biespecífico, la inclusión de dichos polipéptidos cargados favorece la formación de heterodímeros y disminuye la formación de homodímeros. Con preferencia, un polipéptido con carga positiva contendrá un contenido sustancial de arginina, glutamina, histidina y/o lisina (o mezclas de dichos aminoácidos) y un polipéptido de carga negativa contendrá un contenido sustancial de aspartato o glutamato (o una mezcla de dichos aminoácidos). Los polipéptidos con carga negativa que contienen un contenido sustancial de lisina y los polipéptidos con carga negativa que contienen un contenido sustancial de glutamato se prefieren en particular. Con el fin de maximizar la atracción electrostática de dichos polipéptidos con cargas opuestas, se prefiere emplear polipéptidos capaces de asumir espontáneamente una conformación helicoidal.

[00597] De este modo, en una realización preferida, un “E-coil” con carga negativa se anexará a uno de los polipéptidos que se usan para formar un DART biespecífico y un “K-coil” con carga negativa se anexará al segundo de los polipéptidos DART (**Figura 37**).

[00598] Un E-coil particularmente preferido tendrá la secuencia: (**EVAALEK**)$_4$:

SEC ID NRO.: 299 EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

[00599] Un K-coil particularmente preferido tendrá la secuencia: (**KVAALKE**)$_4$:

SEC ID NRO.: 300 KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

[00600] Un polipéptido DART preferido que posee dicho E-coil tendrá la secuencia general: [Dominio VL]—[**GGGSGGGG**]—[Dominio VH]—[(**EVAALEK**)$_4$]—**GGGNS,** donde VL es el dominio Ig liviano variable del DART, **GGGSGGGG** es **SEC ID NRO.: 10**, VH es el dominio Ig pesado variable del DART, (**EVAALEK**)$_4$ es **SEC ID NRO.: 299**, y **GGGNS** es **SEC ID NRO.: 301**. Un polipéptido DART preferido que posee dicho K-coil tendrá la secuencia general: [Dominio VL]—[**GGGSGGGG**]—[Dominio VH]—[(**KVAALKE**)$_4$]—**GGGNS,** donde VL es el dominio Ig liviano variable del DART, **GGGSGGGG** es **SEC ID NRO.: 10**, VH es el dominio Ig pesado variable del DART, (**KVAALKE**)$_4$ es **SEC ID NRO.: 300**, y **GGGNS** es **SEC ID NRO.: 301**.

6,16 DARTS QUE CONTIENEN FC DE E-COIL / K-COIL

[00601] En una realización adicional, las regiones Fc pueden ligarse a los circuitos DARTs E y/o K de E-coil o K-coil.

[00602] Siguiendo la separación entre las regiones Fc y el dominio VH DART de un DART que contiene Fc se desea en casos en los cuales una disposición menos separada de dichos dominios produce reducida interacción entre dichos dominios y sus ligandos de unión o interfiere de otro modo con el montaje de DART. Aunque los separadores de cualquier secuencia de aminoácidos puede emplearse, se prefiere emplear separadores que forman bucles de hélice α, con el fin de extender en forma máxima y proyectar el dominio Fc alejándolo de los dominios variables (**Figura 37**). Debido a los polipéptidos en bucle descritos con anterioridad de carga opuesta en forma adicional funcionan para promover la formación de heterodímeros, dichas moléculas son separadores particularmente preferidos. Dichas moléculas que contienen moléculas Fc-DART proveen beneficos similares a los de Fc-DARTS, que incluyen mejorada vida media sérica y reclutamiento de la función efectora. The above-described E-coil and K-coil polipéptidos are en particular preferred for this purpose.

[00603] De este modo, en una realización preferida, el DART de E-coil que contiene Fc DART tendrá la secuencia general: [Dominio VL]—[**GGGSGGGG**]—[Dominio VH]—[(**EVAALEK**)$_4$]—**GGG**— dominio Fc comenzando con D234 (Numeración según Kabat), donde VL es el dominio Ig liviano variable del DART, **GGGSGGGG** es **SEC ID NRO.: 10**, VH es el dominio Ig pesado variable del DART y (**EVAALEK**)$_4$ es **SEC ID NRO.: 299**.

[00604] En forma similar, en una realización preferida, el DART que contiene Fc de K-coil tendrá la secuencia general: [Dominio VL]—[**GGGSGGGG**]—[Dominio VH]—[(**KVAALKE**)$_4$]—**GGG**—Fc dominio comenzando con D234 (Numeración según Kabat), donde

VL es el dominio Ig liviano variable del DART, **GGGSGGGG** es **SEC ID NRO.: 10**, VH es el dominio Ig pesado variable del DART y (**KVAALKE**)$_4$ iess **SEC ID NRO.: 300**.

[00605] Como se indicó con anterioridad, una molécula DART que contiene bucle o una molécula DART que contiene Fc que contiene bucle puede contener sólo uno de sus separadores únicos de bucle, o pueden contener más de uno de dichos separadores (*por ej.*, dos separadores, con preferencia de carga opuesta, de los cuales uno está ligado al dominio VH de los polipéptidos DART). Al ligar la región Fc con dicha(s) molécula(s) separadoras, la capacidad de producir versiones bivalentes, tetravalentes, etc. de las moléculas DART Fc por intercambio de cadena se potencia (**Figura 39**). Como se muestra en la **Figura 39**, las moléculas Fc-DART pueden producirse para formar monómeros o dímeros dependientes de si el dominio Fc está ligado a uno o ambos de los dominios DART VH.

6.17 ACTIVIDAD FUNCIONAL DE DARTS QUE CONTIENEN FC DE E-COIL / K-COIL

[00606] Las especies de DART de Fc de E-coil y/o K-coil se produjeron a partir de moléculas DART bi-específicas que tienen: (1) las regiones variables liviana y pesada del anticuerpo reactivo CD79b (complejo BCR), CB3 y (2) las regiones variables liviana y pesada de una variante de baja afinidad (denominada variante “YA”) del anticuerpo reactivo CD32B, 2B6. Esta región variable de cadena liviana de este anticuerpo difiere de la del anticuerpo 2B6 en contener las mutaciones: N50Y and V51A. De este modo, el anticuerpo YA2B6 tiene una secuencia de región variable de cadena liviana:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFTFGGGTKVEIK (**SEC ID NRO.: 302).**

[00607] La secuencia de la región variable de cadena pesada de este anticuerpo es:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWMGVIDPSDT
YPNYNKKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDYYSGMDYWG
QGTTVTVSS **(SEC ID NRO.: 303); o**

[00608] El anticuerpo de baja afinidad se seleccionó ya que se unirá en forma preferencial a CD32B ***in cis*** en células que expresan CD79b (Células B). Así, la configuración disminuirá la interacción con otras células que expresan CD32B (monocitos, células endoteliales, hígado) así como también la trans-interacción indeseable

[00609] Los derivados E-coil y/o K-coil y derivados que contienen Fc- de E-coil y/o K-coil de dichos h2B6YAhCB3 DARTS se realizaron. Se usó cromatografía por exclusión de tamaño para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de las moléculas producidas. Como se muestra en la **Figura 40**, se formaron dímeros a partir de E-coil / K-coil DARTS que tienen una región Fc de ligadura simple unida a un dominio K-coil así como también a DARTS E-coil / K-coil que tienen una región Fc de ligadura simple ligada a un dominio E-coil. El monómero deseado, así como también las moléculas de dímero se recuperaron de las preparaciones en las cuales las regiones Fc se ligaron a ambos E y coils de la misma

molécula DART, con donde el monómero es el producto mayoritario formado. La **Figura 41** muestra la posible estructura de las moléculas de dímeros producidos.

[00610] La cromatografía por exclusión de tamaño y fracciones se analizaron con el uso de SDS-electroforesis con gel de poliacrilamida para analizar en forma adicional las estructuras de las moléculas producidas (**Figura 42**). Los derivados de DART E-coil / K-coil (sin región Fc) migraron como dos bandas predominantes cada una de aproximadamente 28 kD (correspondiente al polipéptido que contiene KFc y el polipéptido levemente menor que contiene EFc) y una banda menos prominente a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART de E-coil / K-coil). La fracción de monómeros de los derivados DART que contienen Fc de E-coil / K-coil (EFc/K o E/KFc) de la cromatografía por exclusión de tamaño y sólo mostraron la banda de peso molecular mayor o menor a aproximadamente 28 kD (correspondiente a si el DART era el DART que contiene (banda de peso molecular más grande) o el DART que contiene EFc (banda de peso molecular más pequeño). El material migró en forma predominante a aproximadamente 49 kD (correspondiente al DART de E-coil / K-coil). Se observaron además bandas de peso molecular superior.

[00611] Un ELISA de unión biespecífica se realizó para caracterizar las moléculas producidas. CD79 se colocó en una placa de ELISA. Los DARTs luego se unieron a la placa. La unión de DART se detectó con el uso de sCD32B-biotina seguido de incubación con estreptavidina-HRP. Como se muestra en la **Figura 43**, los derivados de DART de E-coil / K-coil que contienen Fc h2B6YAhCB3 (EFc/K o E/KFc) mostraron potenciación significativa de la unión con relación a un DART h2B6YAhCB3, o a un derivado DART EFc/KFc h2B6YAhCB3.

[00612] El entrecruzamiento de anticuerpos que se han unido a CD79b conduce a activación de células B (Van Kooten, C. et al. (1997) “Cross-Linking Of Antigen Receptor By Ig-B (B29, CD79b) Can Induce Both Positive And Negative Signals In CD40-Activated Human B Cells,” Clin. Exp. Immunol. 110:509-515). Dado que las moléculas DART h2B6YAhCB3 moléculas son capaces de unirse a ambos CD79b y el receptor inhibidor de CD32B, tienen la la capacidad de “reclutar” CD32B a los sitios de unión a CD79b, y de este modo bloquear proliferación de las células B. Para demostrar esta capacidad, los DARTS se incubaron con células B que se habían expuesto a anticuerpos capaces de entrecruzar los anticuerpos anti-CD79b adheridos. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 44**. Los resultados muestran que los anticuerpos dirigidos solamente contra CD79b o CD32B (Ch2B6N297Q y ChCB3.1N297Q, respectivamente) no lograron inhibir la proliferación de las células B. Los derivados DART EFc/KFc h2B6YA x hCB3 fueon en forma sustancial más efectivos en la inhibición de proliferación de las células B, como lo fue el DART h2B6YA x hCB3 mismo y el control h2B6YA x hCB3 VF. Los DARTS E-coil / K-coil que tienen una única región de Fc relacionada (derivados DART E/KFc h2B6YA x hCB3 y derivados DART

EFc/K h2B6YA x hCB3) se encontró que ejercen la mayor inhibición sobre la proliferación de las células B.

6.18 MODIFICACIONES DE DART PARA ALTERAR LA VIDA MEDIA SÉRICA *IN VIVO*

[00613] Como se discutió con anterioridad, las moléculas de anticuerpo recombinante pequeñas tales como moléculas de cadena simple biespecíficas (*por ej*., que poseen una masa molecular de aproximadamente 55 kDa) se limpian rápidamente de la circulación. Los estudios de farmacocinética *in vivo* de moléculas DART en ratones mostraron la vida media terminal corta esperada de aproximadamente 2 horas.

[00614] En algunas realizaciones, tales como en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria aguda, dicha vida media corta se desea, sin embargo, en otras realizaciones tales como en el tratamiento del cáncer y enfermedades y afecciones crónicas, se prefiere que las DART de la presente invención inhiban vidas medias superiores.

[00615] Con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de las moléculas DART para dichos usos, las moléculas DART pueden modificarse para contener una porción de polipéptido de una proteína que se une al suero en uno o más de los términos de la molécula DART. Con mayor preferencia, dicha porción de polipéptidos de una proteína que se une al suero se instalará en el extremo terminal C de la molécula DART. Una porción de polipéptido particularmente preferida de una proteína que se une al suero para este fin es el dominio que se une a la albúmina (ABD) de la proteína G de estreptococo. El dominio que se une a la albúmina 3 (ABD3) de la cepa de la Proteína G de Estreptococo G148 se prefiere en particular.

[00616] El dominio que se une a la albúmina 3 (ABD3) de la cepa de la Proteína G de Estreptococo G148 consiste en 46 residuos de aminoácidos que forman un manojo de hélice y tiene amplia especificidad de unión a la albúmina (Johansson, M.U. *et al*. (2002) "*Structure, Specificity, and Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Module*s," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). La albúmina es la proteína más abundante en plasma y tiene una vida media de 19 días en humanos. La albúmina posee varios sitios pequeños de unión a la molécula que le permiten unirse en forma no covalente a otras proteínas y por lo tanto extender sus vidas medias séricas.

[00617] Para demostrar la capacidad de una porción de polipéptido de una proteína del suero de extender la vida media de un DART, el dominio de proteína de estreptococo G ABD3 se fusionó a un DART biespecífico recombinante (inmuno reactivo con los antígenos hCD16 y hCD32B antigens) para generar una molécula de anticuerpo recombinante, ABD-DART hCD16-hCD32B (**Figura 45**). Esta ABD-DART mostró unión específica a ambos antígenos así como también con albúmina de suero humano (HSA) y fue capaz de redirigir células efectoras in vitro. Cuando se comara con el DART de control, este ABD-DART mostró un fuerte aumento de la media sérica en ratone. Este método puede usarse como una vía viable

para aumentar la vida media de productos farmacéuticos potencialmente importantes como DART hasta más del 90 minutos, más de 2 horas, más de 5 horas, más de 10 horas, más de 20 horas, y con mayor preferencia, más de 30 horas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

[00618] ***Diseño y Construcción de ABD DART***: hCD16-hCD32B ABD DART se hizo con el uso de la cadena 1:

hCD16VL-G3SG4-hCD32BVH-K coil [$(KVAALKE)_4$]

donde CD16VL denota el 3G8 CD16VL, G3SG4 denota **SEC ID NRO.: 10**, hCD32BVH denota el 2B6 CD32BVH, y $(KVAALKE)_4$ denota **SEC ID NRO.: 300**;

y como cadena 2:

hCD32BVL-G3SG4 –hCD16VH-GGCGGG-E coil [$(EVAALEK)_4$]-GGGNS- ABD

donde CD32BVL denota CD32BVL, G3SG4 denota **SEC ID NRO.: 10**, hCD16VH denota CD16VH, GGCGGG son los residuos 2-7 of **SEC ID NRO.: 267**, E coil [$(EVAALEK)_4$] es **SEC ID NRO.: 299**, GGGNS is **SEC ID NRO.: 301**, y ABD es:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALIDE ILAALP (**SEC ID NRO.: 304)**

[00619] De acuerdo con lo anterior, la secuencia de la cadena 1 (h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGGNS) es:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YWIHWVRQAP GQGLEWIGVI DPSDTYPNYN KKFKGRVTMT VVVSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCARNGD SDYYSGMDYW GQGTTVTVSS GGCGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKEGGGNS **(SEC ID NRO.: 305)**

[00620] A una cadena preferida que codifica los polinucleótidos 1 (h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGGNS) es:

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat
tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc
ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag
aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct

(SEC ID NRO.: 306)

[00621] De acuerdo con lo anterior, la secuencia de la cadena 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-Ecoil-GGGNS-ABD) es:

EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT FTCRTSQSIG TNIHWYQQKP DQSPKLLIKE
VSESISGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAATYYCQQ SNTWPFTFGG
GTKVEIKGGG SGGGGQVTLR ESGPALVKPT QTLTLTCTFS GFSLSTSGMG
VGWIRQPPGK ALEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SKNQVVLTMT
NMDPVDTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA
LEKEVAALEK EVAALEKGGG NSLAEAKVLA NRELDKYGVS DYYKNLINNA
KTVEGVKALI DEILAALP **(SEC ID NRO.: 307)**

[00622] Una cadena preferida que codifica los polinucleótidos 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-Ecoil-GGGNS-ABD) es:

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca
gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga
gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct
gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag
gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc
aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa
gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag
gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc
aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca
aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct

(SEC ID NRO.: 308)

[00623] Cada segmento de VL y VH se amplificó por PCR con el uso de DART hCD16-hCD32B como patrón. Para la cadena 2, las secuencias de nucleótidos que contienen E coil y ABD se formaron por el primer dímero y luego se subclonaron en el extremo terminal C de la región VH de hCD16 con el uso de digestión por restricción y Ligación. Ambas cadenas se clonaron en vector pCIneo (Promega, inc.) en los sitios NheI-NotII. Los plásmidos individuales que rodean la respectiva cadena 1 digerida en NgoMIV-NheI y los casetes de expresión de cadena 2 digeridos en BstBI-PmeI se clonaron a continuación en un plásmido individual para transfección en células CHO para generar líneas celulares estables.

[00624] ***Expresión y Purificación de proteína***: Para la transfección estable, se transfectaron células CHO-S con plásmido de ADN de hCD16-hCD32B EK ABD-DART. La proteína ABD-DART se purificó por cromatografía por afinidad con el uso de la versión soluble del antígeno FcRIIB acoplado a Sepharose 4B activado por CNBr. La proteína purificada se

purificó en forma adicional por cromatografía por exlcusión de tamaño con el uso de Superdex 200HR 10/30.

[00625] ***Ensayo de unión por ELISA***: Para la captura basada en CD-16, se recubrieron placas con antígeno FcRIIB a una concentración de 2ug/mL a 4°C durante durante toda la noche. Luego se bloquearon las placas con 0,5% Peptona en PBS-T. Las proteínas purificadas diluidas en una dilución serial de unieron en la placa durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la detección se realizó con el uso de CD32B biotinilado (50 ng/mL) seguido de Estreptavidina conjugada con HRP (1/1000, BD-Pharm). La actividad de HRP se midió por el agregado de TMB y la placa se leyó en un lector de placa a OD 450nm.

[00626] Para la captura de albúmina de suero humano (HSA), las placas se recubrieron con HSA a una concentración de 2ug/mL a 4°C durante durante toda la noche. Luego de eso se siguieron los mismos procedimientos para realizar el ELISA por afinidad dual.

[00627] ***Ensayo ADCC mediado por células mononucleares de sangre periférica ADCC***: La citotoxicidad se midió por ensayo de liberación de LDH. Se purificaron Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana completa (Lonza Walkersville, Inc, Gaithersburg, MD) por centrifugado gradiente por densidad Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) siguiendo la instrucción del fabricante. 2 x 10^4 células de destino se colocan en placas en cada pocillo de una placa para cultivo de tejidos de 96 pocillos de base redonda. Una dilución serial de uno a cuatro de diferentes moléculas DART o anticuerpo se agrega a las células en la placa. Luego de eso, 6 x 10^5 PBMCs se agregan a los mismos pocillos. Luego se incuba la placa durante toda la noche a 37 °C e incubador de 5% CO_2. La placa luego se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos, 50 µl del sobrenadante se transfieren a una placa ELISA de base plana. 50 µl de la solución de sustrato de LDH (Promega) se agrega a cada pocillo, y la placa se incuba durante for 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego 50 µl de solución de inactivación se agrega a cada pocillo, y la placa se lee a 490 nm dentro de una hora. El porcentaje de citotoxicidad de cada pocillo se calcula con lectura O.D como

(Muestra – AICC)/(Máx de destino– Blanco espontáneo) x 100

donde AICC es la citotoxicidad celular que depende del anticuerpo. La curva de dosis respuesta se genera con el uso de software Prism.

[00628] ***Estudio de farmacocinética***: Los ratones C57Bl/6 recibieron con una inyección intravenosa única de hCD16-hCD32B DART a 5mg/kg. Se recolectó el suero de ratón antes de la dosis, 2, 30 min; 1, 3, 6, 24 y 72 h. La concentración de DART hCD16-hCD32B en el suero se cuantificó. Los cálculos de farmacocinética de DART hCD16-hCD32B se realizaron por medio del paquete de software de farmacocinética WinNonlin Professional 5.1 (Pharsight Corporation, USA). Los parámetros se determinaron por análisis no compartimental (NCA). El análisis no compartimental se basó en un modelo (Model 201) que requiere una inyección

intravenosa del medicamento. El método trapezoidal linealse usó para cálculo de los parámetros.

RESULTADOS

[00629] ***Estudio de expresión y unión por ELISA***: El ABD-DART hCD16-hCD32B se expresó en forma eficiencte a una concentración de 6,5 mg por litro en células CHO-S de mamíferos CHO-S. La actividad de unión de la proteína ABD-DART purificada a los antígenos respectivos se evaluó por ELISA. Los resultados mostraron que ABD-DART hCD16-hCD32B se une en forma simultánea con ambos de los antígenos, CD16 así como también con CD32B (**Figura 46A**). El perfil de unión coincide con la unión de la proteína de control DART hCD16-hCD32B. La afinidad del ABD-DART hCD16-hCD32B purificado a la albúmina de suero humano (HSA) también se demostró por ELISA (**Figura 46B**). El resultado mostró fuerte unión fusión de ABD DART a HSA, mientras que no se observó unión con DART hCD16-hCD32B de control. Para demostrar que la molécula ABD-DART era capaz de unión simultánea a CD32B, CD16A y HSA, a una inyección de ABD-DART sobre la superficie con HSA inmovilizado le siguieron inyecciones consecuentes de 200nM CD32B y 200nM CD16A(F158) (**Figura 46C**, línea sólida). En el experimento de control (**Figura 46C**, línea punteada) los antígenos se reemplazaron con buffer. Los resultados muestran que la molécula ABD-DART era capaz de unión simultánea a CD32B, CD16A y HSA.

[00630] El ABD-DART hCD16-hCD32B y su derivado de fusión ABD se encontraron que exhiben unión equivalente a CD32B soluble (sCD32B) y a CD16A(158F) soluble (sCD16A); los DARTs podrían distingirse por la capacidad de la fusión de DART ABD de unirse a la albúmina de suero humano (HSA); (**Figuras 46D-46I**). Los DARTs se incubaron en placas recubiertas por CD16A y la unión se detectó con el uso de sCD32B biotinilado en la presencia o ausencia de 3 mg/ml HSA (el bloqueo se realizó con 0,5% peptona en PBS-T). La fusión DART ABD se encontró que retiene la unión bi- específica del DART de origen, y exhibe la unión a sCD16A y CD32B que no se vio afectada por la presencia de albúmina de suero humano (**Figura 46J**).

[00631] ***Citotoxicidad In vitro de ABD-DART***: Con el fin de demostrar la unión simultánea de este ABD-DART biespecífico a dos antígenos, uno sobre la célula generadora de respuesta uno sobre una célula blanco, el ensayo de matanza redirigida se realizó. con el uso de PBMC humanas como células efectoras, ABD-DART hCD16-hCD32B indujo potente citotoxicdad, dependiente de la dosis contra líneas de células B positivas de CD32B, Daudi (**Figura 47A**). El resultado muestra que la potencia de ABD-DART fue equivalente a la del DART de origen. El DART CD16xCD32B puede unirse a células efectoras que expresan CD16B y por lo tanto reclutar dichas para matar (por matanza redirigida) células que expresan CD32B. El DART CD16xCD32B se encontró de este modo que muestra potente matanza contra células Raji (**Figura 47B**).

[00632] ***Propiedades de Farmacocinética de ABD-DART***: Las propiedades de farmacocinética de ABD-DART hCD16-hCD32B se analizaron por ELISA de las muestras de suero desués de una dosis única i.v. injection en ratones C57Bl/6 (**Figura 48**). Ambas de las proteínas, DART y ABD-DART mostraron eliminación bifásica de la circulación. El estudio de PK de ABD-DART mostró un tiempo de circulación prolongado, con un aumento de la vida media terminal de 35,1 h cuando se compara con 1,2 h para el DART regular (**Figura 48**, **Tabla 17**). La mejora de las propiedades de farmacocinética también se demostró por comparación del área bajo la curva (AUC). Para la construcción ABD-DART el AUC aumentó por un factor de casi 30 después de la fusión a ABD (**Tabla 17**).

Tabla 17

	ABD-DART	DART
T ½ (hr)	35,1	1,2
Cmax (μg/mL)	156,3	103,7
Tmax (hr)	0,5	0,033
AUC	4408,2	138,3

[00633] ***Actividad biológica in vivo del ABD-DART***: Con el fin de demostrar que el ABD-DART hCD16-hCD32B mantuvo actividad biológica *in vivo*, una dosis única del ABD-DART o su DART de origen se administraron a los ratones Tg (mCD16-/-hCD16A+32B+) y las concentraciones de células B, células T y células PM se monitorearon. Esto indica que los DARTs fueron capaces de reducir las concentraciones de células B (**Figura 49A**) y se interpretan como indicativas de que una matanza dirigida específicamente de células B se logró *in vivo* hasta que los DARTs se retiraron de la circulación. Las concentraciones de células T (**Figura 49B**) y células PM (**Figura 49C**) no se redujeron por los DARTs, lo que confirma su especificidad.

[00634] En suma, una proteína DART fusionada a un dominio de unión de albúmina (denominado ABD-DART) se diseñó exitosamente y se produjo. El ABD-DART hCD16-hCD32B se encontró que retiene las especificidades por sus dos determinantes antigénicos reconocidos: CD16 y CD32B. ABD-DART se encontró que muestra alta afinidad por albúmina de suero humano. La fusión de ABD no redujo la actividad biológica (*es decir*, la potencia del DART para redirigir la matanza de células tumorales). La fusión de la molécula DART a ABD condujo a la mejora sustancial (aumento) en su vida media *in vivo*, y logró este objetivo sin un aumento drástico de tamaño. La capacidad de retener un tamaño pequeño es significativa y ventajosa ya que facilita la habilidad del DART de difundirse en los tejidos tumorales.

6,19 DARTS RECEPTORES DE CÉLULAS B / Her2

[00635] Se construyó un diacuerpo DART Ig que contenía regiones variables de unión a Her2/neu y al receptor de células T (“TCR”).

[00636] Como se discutió con anterioridad, el TCR se expresa en forma negativa por células T CD4+ o CD8+, y permiten que dichas células reconozcan péptidos antigénicos que se unen y se presentan por proteínas MHC de clase I o clase II de células que presentan antígenos. El reconocimiento del complejo pMHC (péptido-MHC) por medio de un TCR inicia la propagación de una respuesta inmune celular que conduce a la producción de citoquinas y la lisis de la célula que presenta antígenos. HER2/neu, un miembro importante de la familia ErbB, se ha investigado extensivamene debido a su función en varios carcinomas humanos y desarrollo de mamíferos. (Hynes and Stern (1994) Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184; y Dougall et al. (1994) Oncogene 9:2109-2123; Lee et al. (1995) Nature 378:394-398). El gen humano HER2/neu y la proteína HER2/neu se describen en Semba et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82:6497-6501 y Yamamoto et al. (1986) Nature 319:230-234, y la secuencia está disponible en el GenBank como número de acceso X03363. HER2/neu comprende cuatro dominios: un dominio extracelular al cual se une el ligando; un dominio de transmembrana lipofílica; un dominio conservdo intracelular de quinasa de tirosina; y un dominio de señalización terminal de carboxilo que rodea varios residuos de tirosina que pueden ser fosforilados. (Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:1746-1750). La secuencia del dominio extracelular HER2/neu (ECD) se describió en Franklin et al. (2004) Cáncer Cell. 5(4):317-328, y está disponible en Protein DataBank Record 1S78 (2004).

[00637] HER2/neu funciona como receptor del factor de crecimiento y con frecuencia se expresa por tumores tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de células de vesícula, cáncer de ovario y cáncer de pulmón. HER2/neu se sobre expresa en 25-30% de cánceres de mama y ovario humanos, y está asociado con la progresión clínica agresiva y pronóstico deficiente en estos pacientes. (Slamon et al. (1987) Science 235:177-182; Slamon et al. (1989) Science 244:707-712). La sobre-expresión de HER2/neu se ha observado además en otros carcinomas que incluyen carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroide, páncreas y vesícula. (Véase, por ej., King et al. (1985) Science 229:974; McCann et al. (1990) Cancer 65:88-92; Yonemura et al. (1991) Cancer Research 51:1034).

[00638] Una cantidad de anticuerpos monoclonales e inhibidores de moléculas pequeñas de quinasa de la tirosina que se orientan a HER-1 o HER2/neu se han desarrollado, que incluyen, en particular, una variante humanizada de un anticuerpo monoclonal murino conocido como 4D5 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.) que reconoce un epítope extracelular (aminoácidos 529 to 627) en el dominio rico en cisteína II de HER2/neu, que reside muy cerca de la región de membrana de la proteína. Los estudios han demostrado que en las células de cáncer de mama que sobre-expresan HER2/neu, el tratamiento con anticuerpos específicos parao HER2/neu en combinación con agentes quimioterapéuticos (por ej., cisplatino, doxoubicina, taxol) generan una mayor respuesta citotóxica que el tratamiento con quimioterapia sola.

(Hancock et al. (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Arteaga et al. (1994) Cancer 54:3758-3765; Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838). Un posible mecanismo por el cual los anticuerpos HER2/neu podrían potenciar la respuesta a agentes quimioterapéuticos es a través de la modulación de la expresión de proteína HER2/neu o por interferencia con la reparación de ADN. (Stancovski et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:8691-8695; Bacus et al. (1992) Cell Growth & Diff. 3:401-411; Bacus et al. (1993) Cancer Res. 53:5251-5261; Klapper et al. (1997) Oncogene 14:2099-2109; Klapper et al. (2000) Cancer Res. 60:3384-3388; Arteaga et al. (2001) J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s. Aunque en ciertos casos, los anticuerpos anti-HER2/neu tales como HERCEPTIN® proveen beneficio terapéutico a los pacientes, la mayoría de cáncre de mama y otros pacientes exhiben respuestas refractarias a dichos anticuerpos. Estas respuestas reflejan, en parte, diferencias en el grado de sobre-expresión de HER2/neu por las células cancerosas del paciente.

[00639] Como consecuencia de contener regiones variables de unión a Her2/neu y al receptor de células T (“TCR”), elDART tiene la capacidad unirse a células que expresan HER2 y or lo tanto de unirse a dichas células en el dominio capaz de unirse al receptor de células T. Cuando dichas células T se unen a este dominio, se activan para iniciar una respuesta inmunológica que conduce a la matanza de células que expresan HER2.

[00640] Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para dicho DART se proporcionan a continuación, con las secuencias VL y VH mostradas en texto plano, la ligadura VL-VH ligadura que se muestra en el texto subrayado, y la secuencia que codifica el motivo de heterodimerización del extremo terminal C (**SEC ID NRO.: 313:** GFNRGEC o **SEC ID NRO.: 314:** GVEPKSC) que se muestra en negrita y cursiva.

TCRVL-HER2VH secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO.: 315**)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GFNRGE***
C

TCRVL-HER2VH-que codifica la secuencia de ácido nucleico (**SEC ID NRO.: 316**)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct

atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc***ggattcaa caggggagag tgt***

HER2VL-TCRVH secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO.: 317**)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS***GVEPK SC***

HER2VL-TCRVH-que codifica la secuencia de ácido nucleico (**SEC ID NRO.: 318**)

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc***ggagt tgagcccaaa tcttgt***

[00641] En una realización preferida, dichas construcciones se modifican para contener un dominio E coil o K coil que facilita la formación de heterodímeros (*es decir*, dímeros TCRVL-HER2VH x HER2VL-TCRVH). Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para dicho DART se proporcionan a continuación, las secuencias de VL y VH que se muestran en texto plano, la ligadura VL-VH se muestra en texto subrayado, y la secuencia que codifica la ligadura que contiene Cys para dimerización (GGCGGG; residuos 2-7 de **SEC ID NRO.: 267**) que se muestra en cursiva. El dominio de heterodimerización de E coil de K coil tiene doble subrayado (la secuencia "E-coil" preferida es de 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK; **SEC ID NRO.: 299;** la secuencia "K-coil" preferida es de 4 repeticiones heptaméricas de KVAALKE (**SEC ID NRO.: 300**). La secuencia que sigue el E coil o el K coil no tiene función asignada.

TCRVL-HER2VH-E coil secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 319)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GGCGGG*** EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEKGG GNS

TCRVL-HER2VH-E coil-que codifica la secuencia de ácido nucleico (SEC ID NRO.: 320)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc*ggaggatg tggcggtgga*
gaagtggccg cactggagaa agaggttgct gctttggaga aggaggtcgc tgcacttgaa
aaggaggtcg cagccctgga gaaaggcggc gggaattct

HER2VL-TCRVH-K coil secuencia de aminoácidos (SEC ID NRO.: 321)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS*GGCGG*
*G*KVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKEG GGNS

HER2VL-TCRVH-K coil-que codifica la secuencia de ácido nucleico (SEC ID NRO.: 322)

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc*ggagg atgtggcggt*
*gga*aaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt
aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct

[00642] Las moléculas DART que tienen dominios de unión al receptor de Her2 y células T (TCR) se analizaron para determinar su capacidad de mediar la citotoxicidad en múltiples líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de vesícula que se habían caracterizado previamente como que exhiben bajos niveles de expresión de HER2 (y de este

modo se hace refractario al tratamiento con el anticuerpo anti-Her2/neu, Herceptin®. Las líneas celulares de cáncer de mama analizadas son ZR75-1 (HER2 2+) (**Figura 50A**), MCF-7 (HER2 1+) (**Figura 50B**) y MDA-MB468 (HER2-ve) (**Figura 50C**). Las líneas celulares que no son de cáncer de mama analizadas son HT-29 (línea celular de cáncer de colon) (**Figura 50D**) y SW780 (línea celular de cáncer de vesícula) (**Figura 50E**). Como se muestra en la FIG,49A-E, dichas moléculas DART fueron sustancialmente más efectivas que HERCEPTIN® al mediar la citotoxicidad de líneas celulares derivadas de tumor, ambos en términos de concentracines requeridas para lograr la citotoxicidad equivalente, y en términos de los niveles máximos de citotoxicidad observada.

6.20 FUSIÓN DE DART *In vitro* CON ABD A TRAVÉS DE E Y K COILS

[00643] Como se discutió con anterioridad, las moléculas DART de la presente invención pueden diseñarse para exhibir unión biespecífica al receptor NKG2D como afinidad por un hapteno, fluoresceína, de manera tal que pueden servir como adaptadores universales, capaces de co-ligar el receptor NKG2D con moléculas que interactúan con conjugado con patrones de unión a fluoresceína. Para demostrar en forma adicional el uso de ABDs, se construyó un DART con el uso de las cadenas de polipéptidos:

(1) **KYK2VL-4420VH-GFNRGEC** (**SEC ID NRO.: 313**) **- Ecoil**: Este polipéptido se construyó con el uso del dominio VL del anticuerpo antes mencionado KYK 2.0 (Kwong, KY *et al*. (2008) "*Generation, Affinity Maduration and Characterization of A Human Anti-NKG2D human Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity*," J. Mol. Biol. 384:1143-1156; y PCT/US09/54911) y el dominio VH del MAb anti-fluoresceína descrito anteriormente, 4420.

(2) **4420VL-KYK2VH-GVEPKSC** (**SEC ID NRO.: 314**): Este polipéptido se construyó con el uso del dominio VL del MAb anti-fluoresceína descrito anteriormente, 4420 y el dominio VH del anticuerpo KYK 2.0. "Ecoil" denota la secuencia de aminoácidos E coil de 4 repeticiones heptaméricas de EVAALEK; **SEC ID NRO.: 299**.

[00644] Los polipéptidos **KYK2VL-4420VH-GFNRGEC** (**SEC ID NRO.: 313**) **- E coil** y **4420VL-KYK2VH-GVEPKSC** (**SEC ID NRO.: 314**) se transfectaron en células CHO para expresar un DART diseñado como "**KYK2 4420 VF Ecoil**." La purificación de estas moléculas se muestra en la **Figuras 51A** y **51B**. La afinidad del DART **KYK2 4420 VF Ecoil** se determinó por detección NKG2D Fc 012210 de la unión del DART al antígeno FITC capturado. Los resultados del experimento demuestran que el DART fue capaz de unirse a ambas moléculas (**Figura 52**).

[00645] En forma adicional, se hizo una fusión de Kcoil – GGGNS (**SEC ID NRO.: 301**) – ABD, donde "Kcoil" denota la secuencia de aminoácidos de K coil de 4 repeticiones heptaméricas de KVAALKE (**SEC ID NRO.: 300**). La **Figura 53** proporciona un mapa de

restricción del plásmido pPAL7, y muestra la construcciónion del plásmido pPAL7 Kcoil ABD, que expresa la fusión de Kcoil-ABD con el uso de una marca PROFINITY EXACT™ (Bio-Rad, Hercules, CA) para facilitar la purificación. El vector pPAL7 Kcoil ABD se transformó en células de *E. coli* BL21DE3. La expresión de Kcoil ABD marcado se indujo por el agregado de 2 mM IPTG durante 4 horas. La expresión de proteína se verificó por SDS-PAGE o por Transferencia Western. En síntesis, el sistema de marca de fusión PROFINITY EXACT™ incluye mediar la lisis de las células, unión de las proteínas liberadas a una columna de afinidad de subtilisina inmovilizada, lavado de la columna para eluir las proteínas no unidas, aplicando un buffer de elución que contiene flúor para hacer que la subtilisina rápidamente y en forma precisa separe el rótulo de la proteína de fusión después de la secuencia de reconocimiento de la separación, lavado la proteína libre de marca de la columna después de cada separación, y dializar la proteína eluida en PBS. La **Figura 54** muestra un análisis por transferencia Western de proteína ABD K coil purificada por la resina de purificación PROFINITY EXACT™ (pequeña escala de 10 ml de cultivo).

[00646] La proteína Kcoil-AFD obtenida de la resina de purificación PROFINITY EXACT™ PURIFICACIÓN RESIN se purificó en forma adicional con el uso de SDS-PAGE (**Figura 55**). El cultivo de 250 ml *E. coli* produjo 6,523 mg de proteína purificada (**Tabla 18**).

Tabla 18

Fracciones eluidas	Buffer	Conc. (mg/ml)	Volumen	Total Proteína (mg)
1-6	PBS	0,412	6	2,06
7-9	PBS + 100 mM NaF	0,924	1,8	1,663
10-13	PBS + 100 mM NaF	0,800	3,5	2,8
				6,523

[00647] El DART KYK2 4420 VF E coil y la proteína Kcoil ABD se incubaron en PBS durante 30 min a temperatura ambiente para formar un ABD DART E Coil – K Coil que tiene propiedades mejoradas. Los resultados de ELISA muestran que todos los dominios en el complejo son capaces de unirse a sus respectivos ligandos (**Figuras 56A-56C**). Si se desea, la purificación adicional del complejo KYK2 4420 VF E coil y K-ABD puede lograrse con el uso de una columna anti-EK.

[00648] Dado que la formación del complejo es independiente de los dominios articulares de unión del DART, el método anterior puede usarse para generar E Coil – K Coil DARTS ABD que tienen otras especificidades (por ejemplo, por formación de complejo de CD32B (*por ej.*, anticuerpo 2B6) / CD16A (*por ej.*, anticuerpo 3G8) VF E DART con un ABD K Coil).

[00649] De este modo, como se indicó con anterioridad, en una realización de la invención, ambos dominios de unión antígeno que se une a los polipéptidos del DART pueden comprender una secuencia adicional que sirve para conducir la formacón de heterodímero (*por ej.*, un K coil o un E coil) y en forma opcional uno de dichos polipéptidos puede contener

una porción de polipéptido de una proteína que se une al suero capaz de unirse a la proteína sérica (*por ej.*, **Figura 45**). En una realización alternativa, uno, y con preferencia sólo uno, de los polipéptidos que contienen dominio que se une al antígeno del DART pueden comprender dicha secuencia adicional para conducir la formación de heterodímero (*por ej.*, cualquiera de un K coil o un E coil) y el DART puede comprender un complejo con un polipéptido adicional (*por ej.*, tercero) que no contiene un sitio que se une al antígeno, pero que comprende un polipéptido que tiene una secuencia complementaria para conducir la formación de heterodímero (*por ej.*, un K coil donde el polipéptido que contiene el dominio de unión al antígeno del DART comprende un E coil; o un E coil donde el polipéptido que contiene el dominio que se une al antígeno del DART comprende un K coil) y en forma opcional una porción de polipéptido de una proteína que se une al suero capaz de unirse a la proteína sérica. La porción del polipéptido de dicha proteína que se une al suero de dicho polipéptido adicional (*por ej.* tercero) puedeubicarse N-terminal o C-terminal al polipéptido que tiene dicha secuencia complementaria.

6,21 DESINMUNIZACIÓN DEL DOMINIO QUE SE UNE A LA ALBÚMINA

[00650] Como se discutió con anterioridad, las moléculas DART de la presente invención pueden diseñarse para comprender un dominio de unión a la albúmina (ABD) tales como el ABD de la proteína G de estreptococo, y con mayor preferencia el dominio que se une a la albúmina 3 (ABD3) de la cepa de la Proteína G de Estreptococo G148.

[00651] Con el fin de decrease la inmunogenicidad del ABD, las modificaciones de aminoácidos se introdujeron en residuos 60-79 de la secuencia de aminoácidos de ABD3: (**SEC ID NRO.: 304):**

```
LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALIDE ILAALP
41    50     60     70     80   86
```

y se midió el efecto de dichas variaciones sobre la unión de HSA (**Tabla 19**).

Tabla 19

Aminoácido	Unión a HSA	Aminoácido	Unión a HSA	Aminoácido	Unión a HSA
WT	**1**	I65A	1	V71E	0,8
Y60F	1	I65Y	N/A (Low Exp)	V71C	1
Y60L	1	I65H	N/A (Low Exp)	V71W	0,4
Y60I	1	I65Q	N/A (Low Exp)	V71R	1
Y60M	1	I65N	N/B	V71G	1
Y60V	0,87	I65K	0,2	E72F	0,2
Y60S	0,26	I65D	N/B (Low Exp)	E72L	0,3
Y60P	0,43	I65E	N/B (Low Exp)	E72I	0,5
Y60T	0,74	I65C	N/B	E72M	0,4
Y60A	0,56	I65W	N/B	E72V	0,5
Y60H	0,22	I65R	N/B	E72S	1
Y60Q	0,47	I65G	0,2 (Low Exp)	E72P	0,4
Y60N	0,19	A68F	0,1	E72T	0,4

Tabla 19					
Aminoácido	Unión a HSA	Aminoácido	Unión a HSA	Aminoácido	Unión a HSA
Y60K	0,56	A68L	0,06	E72A	1
Y60D	N/B	A68I	0,1	E72Y	0,6
Y60E	N/B	A68M	N/B	E72H	1
Y60C	N/B	A68V	0,05	E72Q	0,34
Y60W	1,7	A68S	0,9	E72N	1
Y60R	0,73	A68P	N/B (Low Exp)	E72K	1
Y60G	N/B (Low Exp)	A68T	0,56	E72D	1
Y61L	0,48	A68Y	0,09	E72C	0,1
Y61I	1,33	A68H	N/B	E72W	0,34
Y61M	1,2	A68Q	N/B	E72R	1
Y61V	1,24	A68N	N/B	E72G	1
Y61S	0,47	A68K	N/B	G73F	0,1
Y61P	0,87 (Low Exp)	A68D	N/B	G73L	0,15
Y61T	1	A68E	N/B	G73I	0,1
Y61A	1	A68C	0,25	G73M	0,1
Y61H	1 (Low Exp)	A68W	0,05	G73V	0,15
Y61Q	0,35	A68R	N/B	G73S	0,3
Y61N	0,26 (Low Exp)	A68G	1	G73P	0,1
Y61K	N/B	K69F	0,2	G73T	0,15
Y61D	N/B	K69L	0,55	G73A	1
Y61E	N/B (Low Exp)	K69I	0,38	G73Y	0,15
Y61C	N/B (Low Exp)	K69M	0,69	G73H	0,15
Y61W	0,33 (Low Exp)	K69V	0,58	G73Q	0,1
Y61R	0,41	K69S	0,47	G73N	0,1
Y61G	0,45	K69P	N/B	G73K	0,1
L64F	0,6 (Low Exp)	K69T	0,15	G73D	0,1
L64I	1	K69A	1	G73E	0,1
L64M	1	K69Y	0,48	G73C	0,1
L64V	1	K69H	0,67	G73W	0,1
L64S	0,55	K69Q	0,6	G73R	0,1
L64P	0,8 (Low Exp)	K69N	0,75	D79F	1
L64T	0,8	K69D	0,19	D79L	1
L64A	0,6	K69E	0,2	D79I	1,2
L64Y	0,85	K69C	0,35	D79M	0,6
L64H	1	K69W	0,27	D79V	1,1
L64Q	0,4 (Low Exp)	K69R	1	D79S	1,2
L64N	0,7 (Low Exp)	K69G	1	D79P	1
L64K	0,5	V71F	0,1	D79T	1
L64D	N/B	V71L	1	D79A	1
L64E	N/B	V71I	1	D79Y	1
L64C	0,6 (Low Exp)	V71M	1	D79H	1
L64W	1,2	V71S	1	D79Q	1

Tabla 19					
Aminoácido	Unión a HSA	Aminoácido	Unión a HSA	Aminoácido	Unión a HSA
L64R	0,94	V71P	1	D79N	1
L64G	1	V71T	1	D79K	1
I65F	0,43	V71A	1	D79E	1
I65L	1	V71Y	0,8	D79C	0,4
I65M	1,1	V71H	1	D79W	0,2
I65V	1	V71Q	1	D79R	1
I65S	0,5	V71N	1	D79G	1
I65P	N/A (Low Exp)	V71K	1		
I65T	0,6	V71D	0,4		

[00652] Para mejorar en forma adicional los ABDs, fue deseable atenuar o eliminar la unión de MHC clase II. Los péptidos de Y60 y Y61 comparten un residuo de bolsillo común en N66 (P6/P7) y también L64 y I65 comparten un residuo de bolsillo P6/P7 en T70. La mutación de N66 a D o E en combinación con T70D se postuló por lo tanto porque tiene la capacidad de eliminar en forma efectiva la unión de MHC clase II. En forma alternativa, se postuló que la unión de MHC clase II podría eliminarse dirigiendo las cuatro anclas p1 Y60, Y61, L64 y I65. De acuerdo con lo anterior se condujo un análisis de proceso de mutación de dos ciclos. La Tabla 20 muestra el resultado del primer ciclo de análisis mutacional.

Tabla 20				
ancla p1	**Mutaciones sugeridas**	**Ligandos MHC II de alta afinidad**	**Puntaje promedio**	**Unión a HSA ***
Y60	-	10	0,6176	
	P1 Y60A	0	0	++
	P1 Y60H	0	0	+
	P1 Y60T			+++
	P1 Y60S			+
	P1 Y60G			(-)
	P7 N66D	2	0,5891	+++
	P7 N66E	3	0,5967	+++
	P7 N66S	4		
Y61	-	12	0,6577	
	P1 Y61A	0	0	+++
	P1 Y61H	0	0	+++
	P1 Y61T			+++
	P1 Y61S			++
	P1 Y61G			++
	P6 N66D	4	0,6120	+++
	P6 N66E	3	0,5940	+++
	P6 N66S	0		
L64	-	11	0,6067	
	P1 L64A	0	0	+
	P1 L64T			+++
	P1 L64S			++
	P1 L64G			+++
	P7 T70D	5	0,5998	(-)
	P7 T70S	4		
I65	-	20	0,6235	

Tabla 20				
ancla p1	**Mutaciones sugeridas**	**Ligandos MHC II de alta afinidad**	**Puntaje promedio**	**Unión a HSA ***
	P1 I65A P1 I65T P1 I65S P1 I65G P7 T70D P7 T70S	0 0 3	0 0	+++ ++ ++ + (-)
V71	- P1 V71A	8 0	0,61430 0	 +++
* Las cuatro clases usadas fueron: +++ (0,7-1,0), ++ (0,4-0,7), + (0,1-0,4), (-) (<0,1) de unión de HSA				

[00653] Los resultados muestran que la mutación del ancla p1 V71 en A fue la opción más efectiva, y sugiere una combinación (1+3) o combinación (2+3). Todas las combinaciones analizadas funcionaron excepto T70D y Y60G.

[00654] Los resultados del segundo ciclo de análisis de mutación se muestran en la **Tabla 21 y Tabla 22**.

Tabla 21 **Y61A / N66S / T70S**	
ancla p1	Aglutinantes de alta afinidad
Y60	4
Y61	0
L64	4
I65	3
V71A Adicional	

Tabla 22 **Resultado**	
Mutacioes de aminoácidos	Unión de HSA
66S /70S	+++
61A / 66S 70S	(-)

[00655] La **Tabla 23** proporciona un resumen de los resultados obtenidos de los dos ciclos de análisis de mutación.

Tabla 23			
Mutaciones de aminoácidos	**Unión de HSA**	**Mutaciones de aminoácidos**	**Unión de HSA***
60A/61A	(-)	70S	+++
60T/61A	(-)	60A/61A/65A	(-)

61A/65A	(-)	60T/61A/65A	(-)
61A/66D	+	60A/61A/71A	(-)
61A/66S	++	60T/61A/71A	(-)
64A/70S	+	61A/65A/71A	(-)
64A/65A	++	61A/66D/71A	+
64A/66D	+	64A/65A/71A	++
64G/65A	N/A	64A/66D/71A	+
64G/66D	(-)	64G/65A/71A	-
65A/66D	++	64G/66D/71A	+
66S/70S	+++	65A/66D/71A	+
66S	+++	Y61A/N66S/T70S	(-)
* Las cuatro clases usadas fueron: +++ (0,7-1,0), ++ (0,4-0,7), + (0,1-0,4), (-) (<0,1) de unión de HSA			

[00656] En base a resultados de mutación por combinación, las siguientes combinaciones de sustituciones se consideran sustituciones preferidas para formar un dominio de unión a la albúmina desinmunizada: 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. El asterisco ("*") denota la posición 71→ P1 y la posición 79 → P9.

[00657] Como se muestra en la **Figura 57**, las variantes ABD que tienen las modificaciones L64A, I65A and D79A o las modificaciones N66S, T70S y D79A:

[00658] LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (**SEC ID NRO.: 323)**,

[00659] LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**S**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (**SEC ID NRO.: 324)**,

exhibieron unión sustancialmente de tipo salvaje.

[00660] Las variantes ABD 61A/65A, 61A/66D, 64A/65A* y 64A/66D se evaluaron junto con el tipo salvaje para determinar su capacidad de unirse a la albúmina. Los resultados de dichos ensayos se muestran en **Figura 58**. Las variantes ABD 64G/66D, 65A/66D, 66S/70S* y 61A/66S/70S se evaluaron junto con el tipo salvaje para determinar su capacidad de unirse a la albúmina. Los resultados de dichos ensayos se muestran en **Figura 59**. La **Figura 60** muestra los resultados de ensayos de unión a la albúmina para las variantes ABD Y60A/Y61A, Y60T/Y61A, I65A/N66D/V71A, Y61A/I65A/V71A, L64A/N66D/V71A y para el tipo salvaje (**SEC ID NRO.: 304**). La **Figura 61** muestra los resultados de ensayos de unión a la albúmina para las variantes ABD Y60A/Y61A/V71A, Y60T/Y61A/V71A, L64A/I65A/V71A y para el tipo salvaje. La **Figura 62** muestra los resultados de ensayos de unión a la albúmina para las variantes ABD L64G/I65A/V71A, L64G/N66D/V71A, Y61A/T70S, N66S, T70S, Y61A/N66S, L64A/I65A y para el tipo salvaje.

6.22 EVIDENCIA DE DESINMUNIZACIÓN DE DOMINIO QUE SE UNE A LA ALBÚMINA

[00661] Las variantes ABD, que incluyen en particular variantes en la posición V71 (*por ej.*, V71A) exhiben una menor inmunogenicidad. Para demostrar dicha desinmunización, tres muestras de péptidos se evaluaron para determinar el potencial inmunogénico con el uso de ensayos de células T en el tiempo EpiScreen™. Las muestras evaluadas fueron fregmentos 21-mer (Y60-E80)) del péptido tipo salvaje ABD (**SEC ID NRO.: 304)**:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALIDE

41 50 60 70 80

ABD Y60-E80 wt ("Muestra 1") (**SEC ID NRO.: 325**):

Y YKNLINNAKT VEGVKALIDE

ABD Y60-E80 Variante N66D/T70S/V71A ("Muestra 2") (**SEC ID NRO.: 326**):

Y YKNLI**D**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ **A**$_{71}$EGVKALIDE

y

ABD Y60-E80 Variante L64A/I65A/V71A ("Muestra 3") (**SEC ID NRO.: 327**):

Y YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT **A**$_{71}$EGVKALIDE

[00662] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de capas leuco plaquetarias de donantes comunitarios sanos (de sangre extraída dentro de 24 horas). Se aislaron PBMC de capas leuco plaquetarias por centrifugado por densidad Lymphoprep™ (Axis-shield, Dundee, UK) y células T $CD8^+$ se eliminaron con el uso de $CD8^+$ RosetteSep™ (StemCell Technologies Inc, London, UK). Los donantes se caracterizaron por identificación de haplotipos HLA-DR con el uso de un kit para tipificación de tejidos basado en HLA SSP-PCR (Biotest, Solihull, UK). Las respuestas de las células T al control de antígenos (Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), [Pierce (Perbio), Cramlington, UK)] así como también péptidos derivados de Gripe A y virus de Epstein Barres también se determinaron. Las PBMC se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se requirió. Se empleó un cohorte de 50 donantes, cuyos alotipos indicaron que la cobertura de > 80% de los alotipos mundiales se había logrado y que los alotipos HLA-DR mayores (alotipos individuals con una frecuencia de >5% expresados en la población mundial) fueron bien representados.

[00663] Las PBMCs de cada donante se descongelaron, re realizó el recuento y se evaluó la viabilidad. Las células se revivieron a temperatura ambiente en medio de cultivo AIM-V®, se lavaron y se re-suspendieron en AIM-V® hasta 4-6 x 10^6 PBMC/ml. Para cada donante, los cultivos celulares se establecieron en los cuales se agregó 1ml de stock de células de proliferación a los pocillos aproximados de una placa de 24 pocillos. Se agregaron medio de cultivo (0,5 ml) y péptido de análisis (0,5 ml) al PBMC para dar una concentración final de 5 μM. Para cada donante, un control de reproducibilidad (células incubadas con 100 μg/ml KLH), y un pocillo de "sólo medio de cultivo" también se incluyeron. Se incubaron los

cultivos durante un total de 8 días a 37°C con 5% CO_2. En los días 5, 6, 7 y 8, las células en cada pocillo se re-suspendieron suavemente y se transfirieron 3 alícuotas de 100 µl a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de base redonda. Los cultivos se pulsaron con 0,75 µCi [^{3}H]-Timidina (Perkin Elmer®, Beaconsfield, UK) en 100 µl de medio de cultivo y se incubaron durante un adicional de 18 horas antes de cosechar sobre placas de filtro (Perkin Elmer) con el uso de un cosechador de células TomTec Mach III™. Los recuentos por minuto (cpm) para cada pocillo se determinaron por recuento por centelleo con Meltilex™ (Perkin Elmer®) en un 1450 Microbeta Wallac Trilux Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer®) en recuento de fondo bajo paralux.

[00664] Con el fin de evaluar el efecto de dicho tratamiento sobre la viabilidad celular, el día 7, los cultivos a granel pueden re-suspenderse suavemente y 20 µl de cada muestra se retiraron de todos los donantes y se mezclaron con 20 µl de azul trypan. Estas muestras luego pueden evaluarse para determinar la viabilidad con el uso de exclusión con colorante azul de tripan on un Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen). La viabilidad con preferencia se expresa como porcentaje de azul de tripan excluido / total de recuento celular. En experimentos conducidos con la muestra 1 (tipo salvaje), y con varios péptidos de prueba distintos de la muestra 2 o muestra 3, se encontró que las células cultivadas permanecieron por sobre el promedio 87% de viabilidad para todos los donantes evaluados. La viabilidad promedio de las células incubadas con medios solos se calculó en un 90% mientras que las viabilidades promedio de células incubadas con péptidos de prueba fueron de 88, 88 y 87% respectivamente. La viabilidad de las células tratadas con KLH fue de 83% lo que no es significativamente diferente a la viabilidad de las células tratadas con péptido. Por lo tanto se concluyó que la incubación de las células (PBMC) con los péptidos no produjo toxicidad obvia durante el período de cultivo celular.

[00665] Los donantes idénticos a los usados en el ensayo de proliferación también se usaron para el ensayo IL-2 ELISpot™. Las células se descongelaron y se revivieron ocmo se describió con anterioridad. Las placas ELISpot (Millipore, Watford, UK) se mojaron previamente y se recubrieron durante toda la noche con 100 µl/pocillo de anticuerpo de captura IL-2 (R&D Systems, Abingdon, UK) en PBS. Luego se lavaron las placas 3 veces en PBS, se incubaron durante toda la noche en buffer de bloqueo (1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) en PBS) y se lavaron en medio AIM-V®. La densidad celular para cada donante se ajustó hasta 4-6 x 10^6 PBMC/ml en medio de cultivo AIM V® y 100 µl de células se agregaron a cada pocillo. 50 µl del péptido de prueba y los controles se agregaron a los pocillos apropiados.

[00666] Los péptidos (ABD Y60-E80 (“Muestra 1”), ABD Y60-E80 Variante N66D/T70S/V71A (“Muestra 2”) (**SEC ID NRO.: 326**) o ABD Y60-E80 Variante L64A/I65A/V71A (“Muestra 3”) (**SEC ID NRO.: 327**) se agregaron a los cultivos a granel de PBMC desprovistas de $CD8^+$. Después de la incubación con las muestras, la proliferación de

céluloas T $CD4^+$ se midió por incorporación de [^{3}H]-timidina en varios momentos de medición con medición paralela adicional de la secreción de con el uso de ELISpot™ (el ensayo IL-2 ELISpot™ comprende una membrana pre-recubierta con anticuerpo de captura que se une a la citoquina secretada). Los péptidos se diluyeron en medio de cultivo AIM-V® (Invitrogen, Paisley, UK) inmediatamente antes de usar y la concentración del ensayo final fue 5μM. KLH se usó como control de reproducibilidad y se almacenó a -20°C como 10 mg/ml de solución stock en agua. Para los estudios, una alícuota de KLH se descongeló antes de diluir inmediatamente a 400 μg/ml en AIM-V® (concentración final 100 μg/ml). Se usó fitohemaglutinina (PHA, Sigma, Poole, UK) como control positivo en el ELISpot™ y un stock de 1 mg/ml se almacenó a -20°C antes de diluir hasta una concentración final de 2,5 μg/ml en cultivos celulares.

[00667] Los péptidos de análisis se evaluaron en cultivos por sextuplicado y, para cada donante, un control negativo (AIM-V® de medio solo), ningún control celular y un control positivo de mitógeno (PHA at 2,5 μg/ml - usado como análisis interno ELISpot™ para la función y viabilidad ceular, Sigma) también se incubaron en cada placa. Luego de un período de incubación de 8 días, las placas ELISpot™ se desarrollaron por lavado secuencial en dH2O y PBS (x3) antes de el agregado de 100 μl de anticuerpo de detección biotinilado, filtrado (R&D Systems) en PBS / 1% BSA. Luego de la incubación a 37°C durante 1,5 horas, las placas se lavaron en forma adicional en PBS (x3) y 100 μl estreptavidina-AP filtrada (R&D Systems) en PBS / 1% BSA se agregó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La etreptavidina-AP se descartó y las placas se lavaron en PBS (x4). Se agregó sustrato BCIP/NBT (R&D Systems) (100 μl) a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo de manchas se detuvo por lavado de los pocillos y las partes traseras de los mismos tres veces con dH2O. Las placas secas se escanearon en un Analizador Immunoscan® y se determinaron las manchas por pocillo (spw) con el uso de software Immunoscan® Version 4.

[00668] Para los ensayos de proliferación y IL-2 ELISpot™, las muestras que inducen respuestas iguales a o de más del doble del umbral empírico de un índice de estimulación (SI) ($SI \geq 2,00$) se consideraron positivas. Para ambos datos de grupos de proliferación (n=3) e IL-2 ELISpot (n=6), las respuestas positivas se definieron por umrales estadísticos y empíricos: La importancia ($p < 0,05$) de la respuesta por comparación de cpm o spw de los pocillos de prueba contra pocillos de control de medio con el uso de test-t de Student de dos muestras no equivalentes; Índice de estimulación de más de o igual que 2 ($SI \geq 2,00$), donde SI = promedio de los pocillos de prueba (cpm o spw) / datos iniciales (cpm o spw). Los datos presentados de este modo se indican como $SI \geq 2,00$, $p < 0,05$. Además, se analizó una variación dentro del ensayo mediante el cálculo del coeficiente de varianza y la desviación estándar (SD) de la materia prima de cultivos replicados.

[00669] Se encontró que el péptido tipo salvaje induce las respuestas de proliferación positivas en el enayo de proliferación de células T con el tiemo EpiScreen™ de las respuestas de células $CD4^+$ T con un SI ≥2,00 ($p < 0,05$) en siete donantes que incluyen una respuesta de frontera (SI ≥ 1,90 ($p < 0,05$)) lo que da una frecuencia de respuesta del 14%. La magnitud promedio (SI) de las respuestas positivas de proliferación de células T (S I≥ 2,00 $p< 0,05$) contra el péptido tipo salvaje fue SI 2,55, lo que fue levemente superior a los dos péptidos desinmunizados (**Tabla 24**). La Tabla 24 proporciona un resumen de magnitud (± SD) de respuestas positivas de proliferación de células T contra los péptidos de análisis y KLH. El SI promedio se calculó a partir del promedio de todas las respuestas de donantes positivas observadas durante el transcurso de tiempo completo (SI≥1,90), $p<0,05$).

Tabla 24

Muestra	SI promedio	SD	% Respuesta
WT	2,55	0,73	14
N66D/T70S/V71A	2,63	0,56	4
L64A/I65A/V71A	2,17	0,24	6
KLH Control	5,38	5,22	92

[00670] De este modo, del ensayo de proliferación, la magnitud (SI) de la respuesta de células T junto con la frecuencia (%) de donantes que responden en el cohorte del estudio indica que el potencial inmunogénico del péptido tipo salvaje se consideró moderada, mientras que el potencial inmunogénico de los péptidos desinmunizados se consideró bajo. Estos datos justifican el hecho de que la eliminación de epítopes de células T específicas tipo salvaje fue exitosa por las mutaciones en N66D/T70S/V71A y L64A/I65A/V71A.

[00671] Los tiempos generales de las respuestas proliferativas pueden proporcionar una indicación respecto de la potencial respuesta de las células T (naïve o recaída). La proliferación máxima de células T detectadas el día 5 indica que las frecuencias existentes del precursor de células T son altas mientras que la proliferación máxima el día 8 indica una baja frecuencia de precursor existente de células T. Un alto potencial inmunogénico sería concordante con la estimulación de células T durante la fase inicial del transcurso del tiempo. El péptido de prueba ABD Y60-E80 Variante N66D/T70S/V71A (“Muestra 2”) (**SEC ID NRO.: 326**) dio 1, 0, 1, y 1 respuesta los días 5, 6, 7, y 8, respectivamente. El péptido de prueba ABD Y60-E80 Variante L64A/I65A/V71A (“Muestra 3”) (**SEC ID NRO.: 327**) dio 0, 1, 2, y 1 respuesta los días 5, 6, 7, y 8, respectivamente. La baja cantidad de donantes que responden observados contra N66D/T70S/V71A y L64A/I65A/V71A hace que este tipo de análisis de cinética de la respuesta de proliferación de células T sea difícil de interpretar aunque las pocas respuestas que se observaron contra estas muestras ocurrieron en la última etapa y justifican la noción de que los individuos sanos no se ceban contra epítopes de células T en estas secuencias.

[00672] Similar a lo que ocurre en el ensayo de proliferación, se registraron respuestas positivas en donantes que produjeron un S I≥ 2,00 con una diferencia significativa ($p < 0,05$) observada entre los antecedentes y spw de prueba (control de medio sin tratar). El péptido N66D/T70S/V71A indujo al 6% de los donantes a responder positivamente en el ensayo IL-2 ELISpot y el péptido L64A/I65A/V71A indujo 4% respuestas positivas. Esto ocurre en contraste con los resultados observados para la secuencia tipo salvaje en la cual se detectaron respuestas positivas IL-2 ELISpot en el 20% del cohorte de donantes. La magnitud promedio de respuestas positivas de las células T de ambos péptidos desinmunizados fue baja a 2,02 y 2,43 (**Tabla 25**) respectivamente, y esto fue similar a lo observado para el péptido tipo salvaje. La **Tabla 25** proporciona un resumen de la magnitud (±SD) de respuestas positivas a la secreción de IL-2 de células T (SI≥2,00, $p<0,05$) contra los péptidos de prueba y KLH. El SI promedio se calculó a partir del promedio de todas las respuestas positivas observadas de donantes. Los datos incluyen respuestas de proliferación del límite (SI≥1,90, $p<0,05$).

Tabla 25

Muestra	SI Promedio	SD	% Respuesta
WT	2,25	0,38	20
N66D/T70S/V71A	2,02	0,15	6
L64A/I65A/V71A	2,43	0,19	4
KLH Control	4,14	2,02	96

Para los dos péptidos de prueba, la correlación general entre los datos del ensayo de proliferación y IL-2 ELISpot™ fue alta donde el 100% y 67% de los donantes que respondieron positivamente en el ensayo de proliferación también respondieron en el ensayo de IL-2 ELISpot. Esta alta correlación entre los dos ensayos también se observó en el KLH de control de reproducibilidad donde 98% de los donantes que respondieron en el ensayo de proliferación también produjeron respuestas en el ensayo de IL-2 ELISpot™ (rango típico 85-100% para el enayo de células T con el transcurso del tiempo EpiScreen™). De este modo, para ambos ensayos de proliferación y de IL-2 ELISpot™, la frecuencia y la magnitud de las respuestas de células T contra los péptidos N66D/T70S/V71A y L64A/I65A/V71A sugieren que puede considerarse que ambos tienen un bajo potencial de inmunogenicidad clínica, cuando se compara con el alto riesgo de inmunogenicidad clínica del péptido tipo salvaje.

[00673] Los datos del ensayo de proliferación y de IL-2 ELISpot muestran que se detectaron respuestas positivas de las células T contra los péptidos de análisis en una cantidad de los donantes. La correlación general entre los ensayos de proliferación e IL-2 ELISpot fue del 98% para KLH, 70% para el péptido tipo salvaje, y 100% y 67% para N66D/T70S/V74A y L64A/I65A/V74A respectivamente. Por lo tanto, los donantes que responden se definieron como aquellos que montaron una respuesta positiva a cada muestra en ambos ensayos de proliferación y de IL-2 ELISpot. Todos los donantes produjeron una respuesta positiva de las células T contra PHA lo que indica que las células en los cultivos *ex vivo* fueron funcionales.

El análisis de los conjuntos de datos combinados de estos dos ensayos indicó que la frecuencia general y la magnitud de las respuestas en ambos ensayos de proliferación y ELISpot era baja para los dos péptidos desinmunizados con 4% de los donantes que respondieron contra ambos N66D/T70S/V71A y L64A/I65A/V71A. Esto ocurre en contraste con los resultados del estudio obtenidos para el péptido tipo salvaje (que tenía una cantidad significativamente superior de respuestas positivas (14% de los donantes respondieron en ambos ensayos de proliferación y de IL-2 ELISpot)). No se llevaron a cabo análisis de ya que las respuestas a los dos péptidos de prueba fueron por debajo del umbral mínimo para este tipo de analisis.

[00674] En suma, el ensayo de células T con el paso del tiempo EpiScreen™ se usó para determinar el potencial de inmunogenicidad clínica de dos péptidos de prueba. La capacidad de los péptidos para inducir respuestas de células T $CD4^+$ medidas por proliferación y IL-2 ELISpot se analizó contra un panel de 50 donantes clasificados como HLA. Los datos del estudio del péptido tipo salvaje habían indicado que el riesgo potencial de inmunogenicidad para el péptido tipo salvaje cue moderado ya que la frecuencia combinada de respuestas de proliferación e IL-2 respuestas fue del 14% en estudio de cohorte. Sin embargo la frecuencia combinada de respuestas de proliferación e IL-2 a los dos péptidos desinmunizados en este estudio fue baja donde 4% de los donantes respondieron contra N66D/T70S/V71A y 6% de los donantes respondieron contra L64A/I65A/V71A.

Los ensayos de células con el transcurso del tiempo EpiScreen™ de múltiples productos biológicos comerciales han demostrado una clara correlación entre el porcentaje de respuestas de células T de donantes en el ensayo EpiScreen™ y el nivel de inmunogenicidad (respuestas del anticuerpo terapéutico anti-proteína) observado en la clínica. Se observaron respuestas de donantes de alta frecuencia en los ensayos EpiScreen™ para anticuerpos inmunogénicos tales como Campath, mientras que se observaron respuestas de donantes de frecuencia relativamente baja para anticuerpos no inmunogénicos tales como Xolair y Herceptina. En general, los productos terapéuticos con proteínas que inducen >10% de respuestas positivas en el ensayo EpiScreen™ están asociados con un riesgo significativo de inmunogenicidad en la clínica. En comparación con productos terapéuticos analizados en ensayos EpiScreen™, los datos muestran que los péptidos desinmunizados N66D/T70S/V71A y L64A/I65A/V71A dan respuestas de células T $CD4^+$ que caen dentro del mismo rango que Xolair, Herceptin y Avastin, y se consideraría que tienen un bajo riesgo potencial de inmunogenicidad. Por lo tanto, se concluye que los péptidos desinmunizados exhiben un perfil de inmunogenicidad favorable en el ensayo de inmunogenicidad EpiScreen™.

6.23 PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS MEJORADAS *in vivo* DE ABD-DARTS

[00675] Como se discutió con anterioridad, el dominio que se une a la albúmina (ABD) de la proteína G de estreptococo se fusionó con el extremo terminal C de un DART (lejos de los

sitios de unión al antígeno) (“ABD-DART”) con el fin de mejorar las propiedades de farmacocinética *in vivo* del DART. El estudio de farmacocinética de dichos ABD-DARTs mostraron un tiempo de circulación prolongado, con un aumento de la vida media terminal de 35,1 h cuando se compara con 1,2 h para DARTs regulares (que carece de ABD). El análisis *In silico* reveló que hay cinco posiciones de ancla p1 con alto potencial de unión a MHC clase II en la secuencia de ABD. Con el fin de producir versión desinmunizada de ABD, mutaciones orientadas al sitio se realizaron en base a la predicción provista por el análisis *in silico*. Luego de varios ciclos de mutaciones simples y combinadas, dos variantes ABD, “ABD (AAA)” y “ABD (DSA)” se obtuvieron con afinidad similar o menor con relación a la del ABD tipo salvaje con albúmina de suero.

L64A/I65A/V71A (“ABD (AAA)”) (**SEC ID NRO.: 328)**:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT **A**$_{71}$EGVKALIDE ILAALP

N66D/T70S/V71A (“ABD (DSA)”) (**SEC ID NRO.: 329)**:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**D**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ **A**$_{71}$EGVKALIDE ILAALP

[00676] Estas dos variantes mostraron mayor reducción en el puntaje de unión con péptidos MHC clase II (**Tabla 26**).

Tabla 26: Evaluación *In silico* de combinaciones de mutación

Combinación de mutación	AA60		AA61		AA64		AA65		AA71	
	Lig.	**Puntaje**	**Lig.**	**Puntaje**	**Lig.**	**Puntaje**	**Lig.**	**Puntaje**	**Lig.**	**Puntaje**
Tipo salvaje	10	0,6102	12	0,6577	11	0,6067	20	0,6235	8	0,6143
ABD (AAA)	10	0,6102	12	0,6577	0	-	0	-	0	-
ABD (DSA)	2	0,5891	4	0,6120	7	0,6086	2	0,5776	0	-

Lig. = Ligandos

[00677] Para observar la vida media sérica de estas dos variantes ABD, se condujo el estudio in vivo de PK en ratones C57Bl/6 con una sola inyección IV de las proteínas a 5 mg/kg. El estudio de PK mostró un tiempo de circulación prolongado similar del ABD mutante (DSA) al ABD tipo salvaje (**Figura 63**). El otro mutante, hCD16xhCD32B ABD (AAA) DART permaneció algunas horas más en el suero que el hCD16xhCD32B EK DART básico. El estudio demuestra de este modo que a pesar de la menor afinidad con albúmina; la fusión de la versión desinmunizada de ABD, (*es decir*, ABD (DSA)) aumenta drásticamente la vida media sérica de Proteínas DART. Dicha mayor vida media sérica puede ser ventajosa para usar este ABD-DART menos inmunogénico como potencial candidato terapéutico, en especial con dosis menos frecuente y/o más baja. Los perfiles de PK de hCD16xhCD32B DARTS ABD se muestran en Tabla 27.

Tabla 27: Perfiles de PK de hCD16xhCD32B DARTS ABD				
	EK DART	**ABD**	**ABD (AAA)**	**ABD (DSA)**
$T_{1/2}$ beta (día)	NA	1,1693	0,2388	1,0883
C_{max} (µg/ml)	60,7800	78.0000	78,3600	94,2100
T_{max} (día)	0,0208	0,0208	0,0208	0,0208
AUC (día*ug/ml)	30,3900	119,8113	42,5868	118,1240
Leyenda: $T_{1/2}$ beta (vida media terminal); **C_{max}** (concentración sérica pico); **T_{max}** (cantidad de concentración con el tiempo está en **C_{max}**); **AUC** (Área bajo la curva (el valor es proporcional a la cantidad total en la sangre del paciente)				

6.24 EFECTO DEL AUMENTO DE LA VALENCIA DE ABD SOBRE LA VIDA MEDIA IN VIVO DE ABD-DARTS RECOMBINANTES

[00678] Se construyeron diferente Proteínas ABD DART, ya sea por fusión de ABD al final de ambas cadenas (**Figura 64A**) o por fusión de ABDs en tánden al final de una cadena (**Figura 64B**). Una construcción también se hizo por fusión de ABD(AAA) en el extremo terminal C de ambase cadenas. En este estudio hCD16xhCD32B Fc DART se generó para comparar la vida media sérica. todas las variantes de ABD mostraron unión biespecífica con ambos de los antígenos (**Figura 65**). Para observar la vida media sérica de todos estos DARTS ABD y DARTS Fc, se condujo un estudio de PK *in vivo* en ratones C57Bl/6 con una única inyección IV de las proteínas a 5 mg/kg. El resultado muestra que la propiedad de extender la vida media de ABD recibe la influencia de la valencia de unión a la albúmina (**Figura 66**). La vida media terminal de DART fusionado con dos ABDs es inesperadamente tres veces mayor que la de DART con un ABD (**Tabla 28**).

Tabla 28: Perfiles de PK de hCD16xhCD32B ABD y DARTS Fc				
	E ABD/K ABD	**E ABD(AAA) / K ABD(AAA)**	**E ABD-ABD/K**	**E Fc/K**
$T_{1/2}$ beta (día)	3,55	0,31	2,29	9,02
C_{max} (µg/ml)	132,20	111,50	130,00	93,97
T_{max} (día)	0,02	0,02	0,02	0,02
AUC (día*ug/ml)	30,3900	119,8113	42,5868	118,1240
Leyenda: $T_{1/2}$ beta (vida media terminal); **C_{max}** (concentración sérica pico); **T_{max}** (la cantidad de concentración con el tiempo está en **C_{max}**); **AUC** (Área bajo la curva (el valor es proporcional a la cantidad total en la sangre del paciente)				

[00679] Muchas modificaciones y variaciones de esta invención pueden realizarse sin alejarse de su espíritu y alcance, como resultará obvio para aquellos con experiencia en la materia. Las realizaciones específicas descritas en este documento se ofrecen por medio de ejemplo solamente, y la invención se limitará solamente por los términos de las reivindicciones anexas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los cuales se refieren las reivindicaciones. Dichas modificaciones pretenden caer dentro del alcance de las

reivindicaciones anexas. Todas las referencias, patentes y no patentes, citadas en este documento se incorporan en este documento a modo de referencia en sus totalidades y para todos los fines hasta el mismo punto que si cada publicación individual o patente o solicitud de patente se incorporara a modo de referencia en su totalidad para todos los fines.

REIVINDICACIONES:

Reivindicación 1. Un polipéptido que comprende una porción de una proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a dicha proteína del suero; en donde dicha porción de la proteína que se une al suero extiende la vida media sérica de dicho polipéptido, con relación a la vida media sérica de dicho polipéptido si carece de dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero.

Reivindicación 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende una porción adicional de una proteína desinmunizada que se une al suero, en donde dichas porciones de dicha proteína desinmunizada que se une al suero son ambas capaces de unirse a dicha proteína del suero.

Reivindicación 3. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero es una porción de un dominio de unión a la albúmina desinmunizada (ABD) de una Proteína G de Estreptococo, o una de sus variantes que se unen a la albúmina.

Reivindicación 4. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho dominio de unión a la albúmina (ABD) de dicha Proteína G de estreptococo es un dominio que se une a la albúmina 3 (ABD3) de la cepa de la Proteína G de Estreptococo G148.

Reivindicación 5. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde dicho dominio de unión a la albúmina comprende:

(A) una variación de valina a alanina en la posición 71, en la posición 74, o en la posición 79;

(B) una variación de leucina a alanina en la posición 64, variación de isoleucina a alanina en la posición 65, y variación de valina a alanina en la posición 71; o

(C) una variación de asparagina a ácido aspártico en la posición 66, una sustitución de treonina a serina en la posición 70, y una variación de valina a alanina en la posición 71.

Reivindicación 6. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde dicho dominio de unión a la albúmina tiene la secuencia de la SEC ID NRO.: 304, SEC ID NRO.: 323, SEC ID NRO.: 324, SEC ID NRO.: 325, SEC ID NRO.: 326, SEC ID NRO.: 327, SEC ID NRO.: 328, o SEC ID NRO.: 329.

Reivindicación 7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho polipéptido comprende una molécula que se une a los antígenos.

Reivindicación 8. La molécula que se une al antígeno de la reivindicación 7, en donde dicha molécula es un diacuerpo compuesto por lo menos por una primera y una segunda cadena de polipéptidos las cuales interactúan entre sí para formar dos sitios que se unen al antígeno, en donde por lo menos one de dicha cadena de polipéptidos comprende dicha segunda porción del polipéptido que comprende dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero que es capaz de unirse a dicha proteína del suero.

Reivindicación 9. El diacuerpo de la reivindicación 7, en donde ambas de dicha primera y segunda cadenas de polipéptidos comprenden segundas porciones de polipéptidos que comprenden dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a dicha proteína del suero.

Reivindicación 10. El diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde dicha primera y dicha segunda cadenas de polipéptidos se unen en forma covalente entre sí.

Reivindicación 11. El diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde dicho diacuerpo se une a:

(A) el receptor del Grupo 2D Asesino Natural o el receptor de células T (TCR); y

(B) un antígeno asociado con el tumor.

Reivindicación 12. La molécula que se une al antígeno de la reivindicación 7, o la molécula de diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde said antigen is un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovarios, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer de cuello de útero, un antígeno de cáncer de páncreas, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer de vesícula, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer de testículos, un antígeno de cáncer de glioblastoma, un antígeno asociado con una enfermedad de las células B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma no de Hodgkins, o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

Reivindicación 13. El uso de una porción de polipéptido de una proteína desinmunizada que se une al suero para extender la vida media sérica de un polipéptido ligado en forma covalente, dicha extensión de la vida media sérica es con relación a la vida media sérica de dicha molécula que se une al antígeno si carece de dicha proteína que se une a la albúmina.

Reivindicación 14. El uso de reivindicación 13, en donde dicho polipéptido comprende una porción adicional de una proteína desinmunizada que se une al suero, en donde dichas porciones de dicha proteína desinmunizada que se une al suero son ambas capaces de unirse a dicha proteína del suero.

Reivindicación 15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en donde dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero es una porción de an albúmina-dominio de unión (ABD) de una Proteína G de Estreptococo, o una de sus variantes que se unen a la albúmina.

Reivindicación 16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde dicho dominio de unión a la albúmina (ABD) de dicha Proteína G de estreptococo es un dominio que se une a la albúmina 3 (ABD3) de la cepa de la Proteína G de Estreptococo G148.

Reivindicación 17. El uso de reivindicación 16, en donde dicho dominio de unión a la albúmina comprende:

(A) una variación de valina a alanina en la posición 71, en la posición 74, o en la posición 79;

(B) una variación de leucina a alanina en la posición 64, variación de isoleucina a alanina en la posición 65, y variación de valina a alanina en la posición 71; o

(C) una variación de asparagina a ácido aspártico en la posición 66, una sustitución de treonina a serina en la posición 70, y una variación de valina a alanina en la posición 71.

Reivindicación 18. El uso de reivindicación 16, en donde dicho dominio de unión a la albúmina tiene la secuencia de la SEC ID NRO.: 304, SEC ID NRO.: 323, SEC ID NRO.: 324, SEC ID NRO.: 325, SEC ID NRO.: 326, SEC ID NRO.: 327, SEC ID NRO.: 328, o SEC ID NRO.: 329.

Reivindicación 19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en donde dicho polipéptido comprende una molécula que se une a los antígenos.

Reivindicación 20. El uso de reivindicación 19, en donde dicha molécula que se une al antígeno es un diacuerpo compuesto por lo menos por una primera y una segunda cadena de polipéptidos las cuales interactúan entre sí para formar dos sitios que se unen al antígeno, en donde por lo menos one de dicha cadena de polipéptidos comprende dicha segunda porción del polipéptido que comprende dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero que es capaz de unirse a dicha proteína del suero.

Reivindicación 21. El uso reivindicación 20, en donde ambas de dicha primera y segunda cadenas de polipéptidos comprenden segundas porciones de

polipéptidos que comprenden dicha porción de dicha proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a dicha proteína del suero.

Reivindicación 22. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 20-21, en donde dicha primera y dicha segunda cadenas de polipéptidos se unen en forma covalente entre sí.

Reivindicación 23. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 20-22, en donde dicho diacuerpo se une a:

(A) el receptor del Grupo 2D Asesino Natural o el receptor de células T (TCR); y

(B) un antígeno asociado con el tumor.

Reivindicación 24. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en donde dicho antígeno es un antígeno de cáncer de mama, un antígeno de cáncer de ovarios, un antígeno de cáncer de próstata, un antígeno de cáncer de cuello de útero, un antígeno de cáncer de páncreas, un antígeno de cáncer de pulmón, un antígeno de cáncer de vesícula, un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer de testículos, un antígeno de cáncer de glioblastoma, un antígeno asociado con una enfermedad de las células B, un antígeno asociado con mieloma múltiple, un antígeno asociado con linfoma no de Hodgkins, o un antígeno asociado con leucemia linfocítica crónica.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un polipéptido (por ejemplo, una molécula que se une a los antígenos) que comprende una porción de polipéptido de una proteína desinmunizada que se une al suero capaz de unirse a dicha proteína del suero. La presencia de la proteína que se une al suero extiende la vida media sérica del polipéptido, con relación a la vida media sérica del polipéptido si carece de la porción de polipéptido de la proteína desinmunizada que se une al suero. La invención se refiere además a métodos y usos que emplean dichas moléculas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MacroGenics, Inc.
Barat, Bhaswati
Huang, Ling
Johnson, Leslie
Bonvini, Ezio

<120> DOMINIOS NO INMUNIZADOS QUE SE UNEN AL SUERO Y SU USO PARA EXTENDER LA VIDA MEDIA EN EL SUERO

<130> 1301.0007P9I

<150> US 61/488,725
<151> 2011-05-21

<160> 329

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
1 5 10

<210> 3
<211> 60
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 3

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

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
50 55 60

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 6
<211> 216
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 6

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

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln

65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 7

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

```
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 8
<211> 217
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 8

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
    210                 215
```

<210> 9
<211> 237
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 9

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
```

```
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

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

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235

<210>  10
<211>  8
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  10

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1               5

<210>  11
<211>  244
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  11

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60
```

```
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65                  70                  75                  80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys


<210>  12
<211>  240
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  12

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
```

```
    130                 135                 140

Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn
                165                 170                 175

Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240

<210>  13
<211>  241
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  13

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln
145                 150                 155                 160

Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp
                165                 170                 175

Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys
            180                 185                 190

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro
        195                 200                 205

Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe
    210                 215                 220
```

```
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Cys


<210>  14
<211>  470
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  14

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

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

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

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

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

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300
```

```
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470

<210>  15
<211>  477
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  15

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
```

```
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475

<210>  16
<211>  243
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  16
```

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

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

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg
225                 230                 235                 240

Gly Glu Cys
```

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> linker plus C-terminus of human IgG-kappa chain

<400> 17

```
Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5                  10
```

<210> 18
<211> 477
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
```

```
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
```

```
    370                 375                 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475

<210>  19
<211>  485
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  19

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

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
            20                  25                  30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
        35                  40                  45

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
                85                  90                  95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
            100                 105                 110

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

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

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                165                 170                 175

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
        195                 200                 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
    210                 215                 220
```

```
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
                245                 250                 255

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
            260                 265                 270

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
        275                 280                 285

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
    290                 295                 300

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
305                 310                 315                 320

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
                325                 330                 335

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            340                 345                 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        355                 360                 365

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
385                 390                 395                 400

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
                405                 410                 415

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
            420                 425                 430

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
        435                 440                 445

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
    450                 455                 460

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
465                 470                 475                 480

Ser Leu Gly Gly Cys
                485

<210>  20
<211>  469
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  20

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60
```

```
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    210                 215                 220

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

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
                245                 250                 255

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
            260                 265                 270

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
    290                 295                 300

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
305                 310                 315                 320

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                325                 330                 335

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

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
        355                 360                 365

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
    370                 375                 380

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
                405                 410                 415

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
            420                 425                 430
```

```
Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
        435                 440                 445

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
    450                 455                 460

Ser Leu Gly Gly Cys
465
```

<210> 21
<211> 466
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 21

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

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

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225                 230                 235                 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
```

```
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
                405                 410                 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

Gly Lys
465

<210>  22
<211>  246
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  22

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125
```

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130   135   140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145   150   155   160

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165   170   175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180   185   190

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210   215   220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225   230   235   240

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                245

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 23

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1   5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 región variable de cadena pesada CDR1

<400> 24

Asn Tyr Trp Ile His
1   5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 3H7 Región variable de cadena pesada CDR1

<400> 25

Asp Ala Trp Met Asp
1   5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 Región variable de cadena pesada CDR2

<400> 26

Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3H7 Región variable de cadena pesada CDR2

<400> 27

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 Región variable de cadena pesada CDR3

<400> 28

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 3H7 región variable de cadena pesada CDR3

<400> 29

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 Light chain variable region CDR1

<400> 30

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 3H7 región variable de cadena liviana CDR1

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 región variable de cadena liviana CDR2

<400> 32

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 región variable de cadena liviana CDR2

<400> 33

Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 región variable de cadena liviana CDR2

<400> 34

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 3H7 región variable de cadena liviana CDR2

<400> 35

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 Región variable de cadena liviana CDR3

<400> 36

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr

1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 3H7 región variable de cadena liviana CDR3

<400> 37

Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 38
<211> 121
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 región variable de cadena pesada

<400> 38

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

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

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 región variable de cadena liviana Hu2B6VL-1

<400> 39

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

```
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

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

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Humanized 2B6 región variable de cadena liviana Hu2B6VL-2

<400> 40

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

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

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Humanized 2B6 región variable de cadena liviana Hu2B6VL-3

<400> 41

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95
```

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

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 42

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 43

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 44

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 45

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr

1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 46

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IgG binding site of FcgammaRIIB receptor

<400> 47

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIIb

<400> 48

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIIb

<400> 49

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIIb

<400> 50

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

<210> 51
<211> 9

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIIb

<400> 51

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIIb

<400> 52

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIIb

<400> 53

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor FcgammaRIIIb

<400> 54

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 55
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Primer Lgh321F

<400> 55
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 56
<211> 47
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Primer Lgh318R

<400> 56
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctccaccttg gtccctc 47

<210> 57
<211> 47
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Primer Lgh319F

<400> 57
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt cagctggtgc agtctgg 47

<210> 58
<211> 43
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Primer Lgh320R

<400> 58
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg 43

<210> 59
<211> 46
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh315R

<400> 59
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctcaagcttg gtcccc 46

<210> 60
<211> 48
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh316F

<400> 60
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt accctgagag agtctggc 48

<210> 61
<211> 47
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh317R

<400> 61
tttgaattcc tagcagcctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc 47

<210> 62
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh339R

<400> 62
ctcaacgcag cctcccagtg agctcac 27

<210> 63
<211> 31
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh340R

<400> 63
aacgcagcct cccagtgagg agacggtgac c 31

<210> 64
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh366R

<400> 64
tttgaattct atttacccgg agacagg 27

<210> 65
<211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lhg367F

<400> 65
ctgggaggct gcgcagagcc caaatcttgt gac 33

<210> 66
<211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh368R

<400> 66
gtcacaagat ttgggctctg cgcagcctcc cag 33

<210> 67
<211> 50
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador Lgh369R

<400> 67
tttgaattct aacactctcc cctgttgaag cagcctccca gtgaggagac 50

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> humanized anti-CD16A Región variable de cadena pesada Hu3G8VH-1

<400> 68

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

```
            20                  25                  30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
    50                  55                  60

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

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

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

<210>  69
<211>  118
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  Anti-CD16A humanizado región variable de cadena pesada  Hu3G8VH-5

<400>  69

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
            20                  25                  30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
    50                  55                  60

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

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

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

<210>  70
<211>  117
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  Anti-CD16A humanizado región variable de cadena pesada Hu3G8VH-22

<400>  70

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
            20                  25                  30
```

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
    50                  55                  60

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

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

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser
        115

<210>  71
<211>  111
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  Anti-CD16A humanizado región variable de cadena liviana Hu3G8VL-1

<400>  71

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

<210>  72
<211>  111
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  Anti-CD16A humanizado región variable de cadena liviana  Hu3G8VL-43

<400>  72

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45
```

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

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

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

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100   105   110

<210> 73
<211> 111
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Anti-CD16A humanizado región variable de cadena liviana Hu3G8VL-22

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20   25   30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35   40   45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Asp
    50   55   60

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

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

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100   105   110

<210> 74
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia de ADN de SEQ ID NO:10

<400> 74
ggaggcggat ccggaggcgg aggc   24

<210> 75
<211> 18
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 75
ttcaacaggg gagagtgt   18

<210> 76
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Linker plus C-terminus of human IgG kappa chain

<400> 76
ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt   30

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 77

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 78
<211> 18
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 78
gttgagccca aatcttgt 18

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 79

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 354
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 80
caggttaccc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60

acttgttctt tctctgggtt ttcactgagg acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggtct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240

ttcctcaaaa tcgccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 81

<211> 354
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 81
caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 60

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 240

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 82
<211> 111
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 82

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

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

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 83
<211> 333
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 83
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 84
<211> 332
<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223> Anti-CD16A humanizado región variable de cadena liviana Hu3G8VL-1

<400> 84
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aa 332

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Humanized 2B6 región variable de cadena pesada

<400> 85

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

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

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 363
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> humanized 2B6 región variable de cadena pesada

<400> 86
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatcctt ctgatactta tccaaattac 180

aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtcg tatccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300

gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Humanized 2B6 región variable de cadena liviana

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 321
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> 2B6 humanizado región variable de cadena liviana

<400> 88
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> sitio de reconocimiento de disociación de trombina

<400> 89

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

<210> 90

<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Factor Xa sitio de reconocimiento de disociación

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa=Glu o Asp

<400> 90

Ile Xaa Gly Arg
1

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> enteroquinasa sitio de reconocimiento de disociación

<400> 91

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> furin sitio de reconocimiento de disociación

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(3)
<223> Xaa=any amino acid

<400> 92

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> sitio de reconocimiento de disociación de furina preferida

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa=any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa=Lys or Arg

<400> 93

Arg Xaa Xaa Arg

1

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> AcTEV sitio de reconocimiento de disociación

<400> 94

Gln Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 95
<211> 487
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> covalent diabody polyprotein precursor

<400> 95

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

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

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

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

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
165 170 175

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

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
210 215 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

```
Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Asp Val Gln Met Thr Gln
                245                 250                 255

Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn
            260                 265                 270

Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln
        275                 280                 285

Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu
    290                 295                 300

Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
305                 310                 315                 320

Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr
                325                 330                 335

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            340                 345                 350

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr
        355                 360                 365

Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly
385                 390                 395                 400

Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
                405                 410                 415

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
            420                 425                 430

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
        435                 440                 445

Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
    450                 455                 460

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465                 470                 475                 480

Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
                485
```

<210> 96
<211> 1464
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de SEC ID NO:97 (precursor de poliproteína de diacuerpo covalente)

<400> 96

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc     60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat    240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac    300
```

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat 780

cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc 840

aagtatttag cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat 900

gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat 960

ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg gactctatta ctgtcaacag 1020

cattatgaat atccagccac gttcggttct gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga 1080

tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc 1140

cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt 1200

gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg 1260

gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc 1320

tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac 1380

tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact 1440

gtgagctcac tgggaggctg ctag 1464

<210> 97
<211> 511
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> precursor de poliproteína de diacuerpo covalente

<400> 97

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

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

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

```
            100                 105                 110

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

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

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

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr
                245                 250                 255

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
            260                 265                 270

Gly Pro Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser
        275                 280                 285

Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser
    290                 295                 300

Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu
305                 310                 315                 320

Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
                325                 330                 335

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu
            340                 345                 350

Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr
        355                 360                 365

Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
    370                 375                 380

Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile
385                 390                 395                 400

Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe
                405                 410                 415

Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
        435                 440                 445

Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
    450                 455                 460

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp
```

```
465                 470                 475                 480

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
                485                 490                 495

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
            500                 505                 510
```

<210> 98
<211> 1536
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de SEC ID NO:99 (precursor de poliproteína de diacuerpo covalente)

<400> 98

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc     60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat    240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac    300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag    360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg    420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca    480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga    540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg    600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg    660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca    720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gcccctgtga agcagaccct gaacttcgac    780

ctgctgaagc tggccggaga cgtggagagc aaccccggcc ccgatgtcca gatgacccag    840

tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt    900

gagagcatta gcaagtattt agcctggtat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt    960

cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatct ggaattccat cgaggttcag tggcagtgga   1020

tctggtacag atttcactct caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat   1080

tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcggtt ctgggaccaa gctggagatc   1140

aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag gttaccctga aagagtctgg ccctgggata   1200

ttgcagccct cccagaccct cagtctgact tgttctttct ctgggttttc actgaggact   1260

tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcaggga agggtctaga gtggctggca   1320

cacatttggt gggatgatga caagcgctat aatccagccc tgaagagccg actgacaatc   1380

tccaaggata cctccagcaa ccaggtattc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat   1440

actgccacat actactgtgc tcaaataaac cccgcctggt ttgcttactg gggccaaggg   1500

actctggtca ctgtgagctc actgggaggc tgctag                             1536
```

<210> 99
<211> 239
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 99

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 100
<211> 720
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 100
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaga 360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 101
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 102
<211> 741
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 102
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca 720

gttgagccca aatcttgtta g 741

<210> 103
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 103

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg
20 25 30

<210> 104
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 104

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 105
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 105

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
            20   25   30

<210> 106
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 106

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg
            20   25   30

<210> 107
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH FR1

<400> 107

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
            20   25   30

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR1

<400> 108

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1   5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR1

<400> 109

Thr Ser Gly Val Gly Val Gly
1   5

<210> 110
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR2

<400> 110

Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR2

<400> 111

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 112

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 113
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 113

His Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 114

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 115
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 115

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1   5   10   15

<210> 116
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 116

His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1   5   10   15

<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 117

Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1   5   10   15

<210> 118
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 118

His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1   5   10   15

<210> 119
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 119

Leu Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1   5   10   15

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 120

His Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 121
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR2

<400> 121

Leu Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 122
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 122

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ile Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 123
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 123

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 124
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 124

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 125
<211> 29
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 125

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 126
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 126

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 127
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 127

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 128
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 128

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 129
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 129

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 130
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 130

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 131
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 131

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 132
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 132

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 133
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 133

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 134
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 134

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 135
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 135

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 136
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 136

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 137
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 137

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 138
<211> 29

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 138

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20   25

<210> 139
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 139

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
            20   25

<210> 140
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 140

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20   25

<210> 141
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 141

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
            20   25

<210> 142
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 142

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ser Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 143
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 143

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 144
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 144

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 145
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 145

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 146
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 146

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 147
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 147

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 148
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 148

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 149
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 149

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 150
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 150

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 151

<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 151

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 152
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 152

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 153
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 153

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 154
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 154

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 155
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 155

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
            20   25

<210> 156
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 156

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
            20   25

<210> 157
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 157

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
            20   25

<210> 158
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 158

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1   5   10   15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
            20   25

<210> 159
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 159

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 160
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 160

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 161
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR3

<400> 161

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 162

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 163

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 164

Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr
1   5

<210> 165
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * CDR3

<400> 165

Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr
1   5

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR4

<400> 166

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1   5   10

<210> 167
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VH derivadas de 3G8 VH * FR4

<400> 167

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1   5   10

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* FR1

<400> 168

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

<210> 169
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* FR1

<400> 169

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

<210> 170
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 170

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 171

Arg Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 172
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 172

Lys Ser Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 173
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 173

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 174

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 175

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 175

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 176

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 177

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 178
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 178

Arg Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 179
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 179

Lys Ser Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 180

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1   5   10

<210> 181
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 181

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1   5   10

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 182

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1   5   10

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 183

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1   5   10

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 184

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1   5   10

<210> 185
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 185

Arg Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 186
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 186

Lys Ser Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 187
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 187

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 188

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 189
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 189

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 190

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 191
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 191

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 192
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 192

Arg Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 193
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 193

Lys Ser Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 194

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 195

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 196
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 196

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1   5   10

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 197

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1   5   10

<210> 198
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 198

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1   5   10

<210> 199
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 199

Arg Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1   5   10

<210> 200
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 200

Lys Ser Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1   5   10

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 201

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 202
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 202

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 203
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 203

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 204
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR1

<400> 204

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 205
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* FR2

<400> 205

Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 206

Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 207
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 207

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1   5

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 208

Trp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1   5

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 209

Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr
1   5

<210> 210
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 210

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1   5

<210> 211
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 211

Asp Ala Ser Asn Leu Ala Thr
1   5

<210> 212
<211> 7
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 212

Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1   5

<210> 213
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 213

Ser Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1   5

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 214

Ser Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1   5

<210> 215
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 215

Thr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1   5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR2

<400> 216

Thr Thr Ser Ser Leu Gln Ser
1   5

<210> 217
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* FR3

<400> 217

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

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 218
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* FR3

<400> 218

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 219

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 220

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 221

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 222

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1   5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* CDR3

<400> 223

Gln Gln Ser Asn Glu Thr Pro Tyr Thr
1   5

<210> 224
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* FR4

<400> 224

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1   5   10

<210> 225
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencias VL derivadas de 3G8 VL* FR4

<400> 225

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1   5   10

<210> 226
<211> 714
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 226
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc   60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac   120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct   180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc   240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac   300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag   360

gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc   420

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 480

ggacaaggcc ttgaatggat tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat 540

caaatgttca aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600

cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agctatgggc 660

tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg agcccaaatc ttgt 714

<210> 227
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 227

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

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

Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu
165 170 175

Thr His Tyr Asn Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
180 185 190

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
195 200 205

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235

<210> 228
<211> 732
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 228
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 420

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 480

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 540

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 600

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 660

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctcattcaac 720

aggggagagt gt 732

<210> 229
<211> 244
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 229

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
130 135 140

```
Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg
145                 150                 155                 160

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp
                165                 170                 175

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp
        195                 200                 205

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
    210                 215                 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn
225                 230                 235                 240

Arg Gly Glu Cys
```

<210> 230
<211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 230

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt     60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca    120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct    240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct    300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag    360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct    420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt    480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag    540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc    600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa    660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt gt                       702
```

<210> 231
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 231

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30
```

```
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
        115                 120                 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230
```

<210> 232
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 232

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc     60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg    120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac    180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc    240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600
```

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgtt caacagggga 720

gagtgt 726

<210> 233
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 233

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly
225 230 235 240

Glu Cys

<210> 234
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 234
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa 660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 235
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 235

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20   25   30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
        35   40   45

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

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65   70   75   80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100   105   110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
        115   120   125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    130   135   140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145   150   155   160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn

```
               165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230

<210>  236
<211>  720
<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  CB3.1-8B5-LGGC

<400>  236
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc     60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg    120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac    180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc    240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720

<210>  237
<211>  240
<212>  PRT
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  CB3.1-8B5-LGGC

<400>  237

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
```

```
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145                 150                 155                 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
                165                 170                 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 238
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh628F Cebador

<400> 238
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

<210> 239
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh629R Cebador

<400> 239
tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

<210> 240
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh630R Cebador

<400> 240
gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

<210> 241
<211> 47
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh631F Cebador

<400> 241
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

<210> 242
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh640R Cebador

<400> 242
tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

<210> 243
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh644R Cebador

<400> 243
tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

<210> 244
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh646R Cebador

<400> 244
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

<210> 245
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh647F Cebador

<400> 245
caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

<210> 246
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh648R Cebador

<400> 246
tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

<210> 247
<211> 1044
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 247
gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc 60

atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag cctggtatct acagaaacct 120

gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct 240

gaagattttg gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct 300

gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa 360

gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca gtctgacttg ttctttctct 420

gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag 480

ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc 600

agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac tgggaggctg cggcggaggg 720

agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 780

tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 840

cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag 900

gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac 960

gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca 1020

aagagcttca acaggggaga gtgt 1044

<210> 248
<211> 348
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 248

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

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met
35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

```
Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
        115                 120                 125

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
145                 150                 155                 160

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
            180                 185                 190

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

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

Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
            260                 265                 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
        275                 280                 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
305                 310                 315                 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                325                 330                 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345
```

<210> 249
<211> 1734
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 249

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc     60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac    120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct    180

gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat    240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac    300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag    360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg    420
```

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggca 780

ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 840

ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 900

ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 960

tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 1020

aaggtggaca agagagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1080

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 1140

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1200

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1260

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1320

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1380

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1440

accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1500

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1560

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1620

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1680

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1734

<210> 250
<211> 578
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 250

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

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

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

```
Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

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

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

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

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
                245                 250                 255

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
            260                 265                 270

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
        275                 280                 285

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
    290                 295                 300

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
305                 310                 315                 320

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
                325                 330                 335

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
            340                 345                 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
```

<210> 251
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 251

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720
```

<210> 252
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 252

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
                165                 170                 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 253
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 253

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420
```

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 254
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 254

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230

<210> 255
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 255
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 256
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 256

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

```
Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 257
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 257

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc     60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg    120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac    180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc    240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg    300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc    360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc    420

tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct    480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca    540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt    600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct    660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc    720
```

<210> 258
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC

<400> 258

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
```

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 259
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC

<400> 259
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 260
<211> 232

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC

<400> 260

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230

<210> 261
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh321F Cebador

<400> 261
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 262
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh386R Cebador

<400> 262
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45

<210> 263
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh784F Cebador

<400> 263
ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

<210> 264
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh785R Cebador

<400> 264
cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38

<210> 265
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh786R Cebador

<400> 265
tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

<210> 266
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Lgh787F Cebador

<400> 266
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

<210> 267
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Linker

<400> 267

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 268
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador

<400> 268

Leu Glu Ile Lys
1

<210> 269
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 269

Thr Val Ser Ser
1

<210> 270
<211> 343
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 270

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    130   135   140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145   150   155   160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165   170   175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180   185   190

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

```
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala
225                 230                 235                 240

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
                245                 250                 255

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
            260                 265                 270

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
        275                 280                 285

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
    290                 295                 300

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
305                 310                 315                 320

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
                325                 330                 335

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340
```

<210> 271
<211> 1032
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa

<400> 271

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc     60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca    120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc    180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct    240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg    300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg    360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct    420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt    480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag    540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc    600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa    660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg gagggagccg aactgtggct    720

gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct    780

gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat    840

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc    900

acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc    960

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg   1020
```

ggagagtgtt ag 1032

<210> 272
<211> 574
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 272

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
                165                 170                 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
                245                 250                 255

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
            260                 265                 270

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
        275                 280                 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
    290                 295                 300
```

```
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305                 310                 315                 320

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
                325                 330                 335

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            340                 345                 350

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545                 550                 555                 560

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

<210> 273
<211> 1722
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-hG1

<400> 273
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc 420

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc 480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcct gggaggctgc 720

ggcggaggga gcgcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 780

agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 840

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 900

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 960

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020

agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1080

ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1140

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1260

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1320

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1380

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1440

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1500

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1560

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1620

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1680

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1722

<210> 274
<211> 335
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 274

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    130                 135                 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
225                 230                 235                 240

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
                245                 250                 255

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
            260                 265                 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
        275                 280                 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
    290                 295                 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
305                 310                 315                 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                325                 330                 335
```

<210> 275
<211> 1005
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400> 275
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac catcggtctt catcttcccg 720

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 780

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 840

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 900

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 960

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 1005

<210> 276
<211> 566
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1 = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

<400> 276

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys

```
                165                 170                 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            260                 265                 270

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        275                 280                 285

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
    290                 295                 300

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
305                 310                 315                 320

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                325                 330                 335

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            340                 345                 350

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        355                 360                 365

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    370                 375                 380

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
385                 390                 395                 400

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                405                 410                 415

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            420                 425                 430

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        435                 440                 445

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    450                 455                 460

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
465                 470                 475                 480

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                485                 490                 495

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            500                 505                 510

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        515                 520                 525

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
```

530 535 540

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
545 550 555 560

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565

<210> 277
<211> 1698
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1

<400> 277
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc 420

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc 480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcgc ctccaccaag 720

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 780

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 840

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 900

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 960

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 1020

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 1080

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 1140

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 1200

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1260

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1320

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1380

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1440

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1500

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1560

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1620

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1680

tccctgtctc cgggtaaa 1698

<210> 278
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 278

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 279
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 279

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
1 5 10

<210> 280
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 280

Leu Glu Gly Glu Glu Gly
1 5

<210> 281
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 281

Leu Glu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5

<210> 282
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 282

Leu Glu Ile Lys

1

<210> 283
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 283

Leu Gly Glu Glu Gly
1   5

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 284

Leu Gly Glu Glu Gly Cys
1   5

<210> 285
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 285

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1   5

<210> 286
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 286

Leu Gly Lys Lys Gly
1   5

<210> 287
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 287

Leu Gly Lys Lys Gly Cys
1   5

<210> 288
<211> 6

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 288

Leu Lys Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 289
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 289

Leu Lys Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 290
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 290

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
1 5

<210> 291
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 291

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 292
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 292

Thr Val Ser Ser
1

<210> 293
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador

<400> 293

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 294
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 294

Val Glu Pro Lys Ser Cys Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5 10

<210> 295
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 295

Val Gln Val His Tyr Arg Met
1 5

<210> 296
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 296

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 297
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 297

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5

<210> 298
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 298

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys
1 5

<210> 299
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E-coil Ligador

<400> 299

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 300
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> K-coil Ligador

<400> 300

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 301
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 301

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 302
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> YA2B6 región variable de cadena liviana

<400> 302

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

<210> 303
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> YA2B6 hregión variable de cadena pesada

<400> 303

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

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

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

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 304
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Albumin Binding Domain

<400> 304

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 305
<211> 279
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGGNS

<400> 305

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260 265 270

Lys Glu Gly Gly Gly Asn Ser
275

<210> 306
<211> 837
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGGNS

<400> 306
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag 360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat 660

tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc 720

ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag 780

aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct 837

<210> 307
<211> 318
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-Ecoil-GGGNS-ABD

<400> 307

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

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

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

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

```
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

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

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
                245                 250                 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn Ser
            260                 265                 270

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
        275                 280                 285

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
    290                 295                 300

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
305                 310                 315
```

<210> 308
<211> 954
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-Ecoil-GGGNS-ABD

<400> 308
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt taccctgaga 360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa 720

gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag 780

gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc 840

aaccgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca 900

aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggccgccct gcct 954

<210> 309

<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 309

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 310
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligador

<400> 310

Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser
1 5

<210> 311
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 311

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
20 25 30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
35 40 45

Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
50 55 60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
65 70 75 80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu
85 90 95

Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
100 105 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
115 120 125

Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
130 135 140

Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
145 150 155 160

Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
165 170 175

Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg
180 185 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met

```
        195                 200                 205

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
    210                 215                 220

Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg
225                 230                 235                 240

Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val
                245                 250                 255

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

Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly
        275                 280                 285

Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln
    290                 295                 300

Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile
305                 310                 315                 320

Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
                325                 330                 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His
            340                 345                 350

Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
        355                 360                 365

Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
    370                 375                 380

<210>  312
<211>  305
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  312

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

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe
            20                  25                  30

Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp
        35                  40                  45

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp
    50                  55                  60

Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys
65                  70                  75                  80

Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu
                85                  90                  95

Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val
        115                 120                 125

Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe
    130                 135                 140
```

```
Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln
145                 150                 155                 160

Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Leu Pro Pro Met Val Asn Val Ile
                165                 170                 175

Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser
            180                 185                 190

Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val
        195                 200                 205

Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly
    210                 215                 220

Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu
225                 230                 235                 240

Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr
                245                 250                 255

His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr
            260                 265                 270

Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
        275                 280                 285

Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
    290                 295                 300

Pro
305

<210>  313
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Ligador

<400>  313

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1               5

<210>  314
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Ligador

<400>  314

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1               5

<210>  315
<211>  241
<212>  PRT
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  TCRVL-HER2VH

<400>  315
```

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
            20                  25                  30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
        35                  40                  45

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            100                 105                 110

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

Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
    130                 135                 140

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
                165                 170                 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
            180                 185                 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 316
<211> 723
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH

<400> 316

```
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc     60

ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg    120

aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg    180

ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa    240

gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg    300

accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag    360
```

tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc 420

ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa 480

tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac 540

aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg 600

acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct 660

atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggattcaa caggggagag 720

tgt 723

<210> 317
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH

<400> 317

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

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

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys

<210> 318
<211> 726
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH

<400> 318
gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagt tgagcccaaa 720

tcttgt 726

<210> 319
<211> 273
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH-E coil

<400> 319

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

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

Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
    130                 135                 140

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
                165                 170                 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
            180                 185                 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn
            260                 265                 270

Ser
```

<210> 320
<211> 819
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TCRVL-HER2VH-E coil

<400> 320

```
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
1               5                   10                  15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr
            20                  25                  30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
    50                  55                  60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys
65                  70                  75                  80

Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
            100                 105                 110

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys
        115                 120                 125

Thr Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr
    130                 135                 140
```

```
Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly
145                 150                 155                 160

Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr
        195                 200                 205

Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly
    210                 215                 220

Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala
225                 230                 235                 240

Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr
                245                 250                 255

Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly
            260                 265                 270

Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly
        275                 280                 285

Thr Thr Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala
    290                 295                 300

Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly
305                 310                 315                 320

Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys
                325                 330                 335

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys
            340                 345                 350

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys
        355                 360                 365

Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr
385                 390                 395                 400

Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys
                405                 410                 415

Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala
            420                 425                 430

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Cys Thr
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys
    450                 455                 460

Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala
465                 470                 475                 480

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr
                485                 490                 495

Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala
            500                 505                 510
```

```
Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly
        515                 520                 525

Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly
    530                 535                 540

Cys Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
545                 550                 555                 560

Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala
                565                 570                 575

Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala
            580                 585                 590

Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala
        595                 600                 605

Gly Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr
    610                 615                 620

Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly
625                 630                 635                 640

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala
                645                 650                 655

Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly
            660                 665                 670

Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly
        675                 680                 685

Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly
    690                 695                 700

Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala
705                 710                 715                 720

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly
                725                 730                 735

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys
            740                 745                 750

Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Cys
        755                 760                 765

Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly
    770                 775                 780

Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala
785                 790                 795                 800

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr
                805                 810                 815

Thr Cys Thr
```

<210> 321
<211> 274
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH-K coil

<400> 321

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

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

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Gly Gly Gly
260 265 270

Asn Ser

<210> 322
<211> 822
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HER2VL-TCRVH-K coil

<400> 322
gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt 720

ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780

aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct 822

<210> 323
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic ABD Construct

<400> 323

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 324
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic ABD Construct

<400> 324

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 325
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Artificial ABD Construct

<400> 325

Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys
1   5   10   15

Ala Leu Ile Asp Glu
            20

<210> 326
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic ABD Construct (ABD Y60-E80 Variant N66D/T70S/V71A)

<400> 326

Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu Gly Val Lys
1   5   10   15

Ala Leu Ile Asp Glu
            20

<210> 327
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic ABD Construct (ABD Y60-E80 Variant L64A/I65A/V71A)

<400> 327

Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Ala Glu Gly Val Lys
1   5   10   15

Ala Leu Ile Asp Glu
            20

<210> 328
<211> 46
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic ABD Construct (L64A/I65A/V71A (“ABD (AAA)”))

<400> 328

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1   5   10   15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Ala Glu
            20   25   30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
        35   40   45

<210> 329
<211> 46

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Synthetic ABD Construct (N66D/T70S/V71A (“ABD (DSA)”))

<400> 329

```
Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1               5                  10                  15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
            20                  25                  30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
        35                  40                  45
```