

MOLÉCULAS DE ANTICUERPO QUE SE UNEN A CD22

La presente divulgación reivindica la prioridad respecto de los documentos WO2016/009030 y GB1601077.9, incorporándose ambos al presente documento por referencia.

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a moléculas de anticuerpo que son al menos específicas para el antígeno CD22, a formulaciones que comprenden dichas moléculas de anticuerpo y al uso de una cualquiera de las mismas en
10 tratamientos. La presente divulgación también se aplica a métodos para preparar dichas moléculas de anticuerpos y dichas formulaciones.

Antecedentes de la invención

Los mecanismos biológicos *in vivo* son cascadas de
15 señales extremadamente complejas que son difíciles de desgranar y comprender. Un ejemplo de dicha señalización es aquella necesaria para activar a los linfocitos B. El receptor de antígenos de los linfocitos B (BCR) está compuesto por moléculas de inmunoglobulina de membrana (mIg)
20 y heterodímeros Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) (α/β) asociados. Las subunidades de mIg se unen a antígenos, dando como resultado la agregación del receptor, mientras que las subunidades α/β transducen señales al interior de la célula. La agregación de BCR activa rápidamente la familia de Src
25 quinasas Lyn, Blk y Fyn, así como las tirosina cinasas Syk y Btk. Esto inicia la formación de un "señalosoma" compuesto por el BCR, las tirosina cinasas anteriormente mencionadas, proteínas adaptadoras, tales como CD19 y BLNK y enzimas de señalización, tales como PLC γ 2, PI3K y Vav.

30 Las señales procedentes del señalosoma activan múltiples cascadas de señalización que implican cinasas,

GTPasas y factores de transcripción. Esto da como resultado cambios en el metabolismo celular, la expresión génica y la organización del citoesqueleto. La complejidad de la señalización del BCR permite muchos resultados distintos
5 que incluyen la supervivencia, la tolerancia (anergia) o la apoptosis, la proliferación y la diferenciación en células productoras de anticuerpos o en linfocitos B de memoria. En resultado de la respuesta está determinado por el estado de maduración de la célula, la naturaleza del antígeno, la
10 magnitud y la duración de la señalización del BCR y de las señales de otros receptores, tales como CD40, el receptor de IL-21 y BAFF-R.

Muchas otras proteínas transmembrana, algunas de las cuales son receptores, modulan elementos específicos de
15 la señalización de BCR. Algunos de estos incluyen CD45, CD19, CD22, PIR-B y FcγRIIB1 (CD32). La magnitud y la duración de la señalización de BCR se ven limitadas por bucles de retroalimentación negativa que incluyen aquellos que implican la vía de Lyn/CD22/SHP-1, la vía de Cbp/Csk,
20 SHIP, Cbl, Dok-1, Dok-3, FcγRIIB1, PIR-B y la internalización del BCR. *In vivo*, los linfocitos B se activan normalmente por células presentadoras de antígenos que capturan antígenos y los presentan sobre su superficie celular. La activación de los linfocitos B por dichos
25 antígenos asociados a membrana requiere de la reorganización citoesquelética inducida por BCR.

Los linfocitos B auto-reactivos son responsables de la producción de autoanticuerpos patógenos que pueden provocar o exacerbar directa o indirectamente las afecciones
30 autoinmunitarias. Se ha usado la eliminación de linfocitos B positivos a CD20 para tratar con éxito una serie de

afecciones autoinmunitarias y por lo tanto, se ha determinado de manera concluyente que los linfocitos B desempeñan un papel importante en provocar o mantener una serie de enfermedades autoinmunitarias, tales como la

5 artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple y la diabetes mellitus de tipo I. Aunque la eliminación de linfocitos B ha sido una opción terapéutica exitosa, existen pruebas de que el control del crecimiento y del estado de activación de los linfocitos B

10 también puede ser una forma eficaz de modular la función de los linfocitos B. Por lo tanto, serían deseables estrategias alternativas que o eliminen a los linfocitos B y que ofrezcan la flexibilidad de controlar a los linfocitos B sin la supresión a largo plazo de la inmunidad

15 de los linfocitos B, que se ha demostrado que está asociada con algunos efectos secundarios. Además, no todas las respuestas o actividades de los linfocitos B son dañinas y las pruebas sugieren que puede ser protector el mantenimiento de poblaciones de linfocitos B reguladores.

20 Dicha estrategia sería eficaz para enfermedades que tengan una función anormal de los linfocitos B provocada por una señalización inadecuada o excesiva de BCR. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, la inflamación, la autoinmunidad y el cáncer. Son

25 particularmente interesantes las enfermedades que tienen una necesidad directa de la señalización de BCR o que requieran de la inhibición o estimulación de respuestas inmunitarias humorales.

El ligamiento conjunto del receptor Fc gamma IIb

30 (CD32b) con el receptor de linfocitos B se produce para regular de manera natural la señalización, en particular

cuando el antígeno está unido a un anticuerpo en pequeños complejos inmunes. Después, CD32b recluta las fosfatasa SHP-1 y SHIP-1, que antagonizan la activación de BCR. Aunque este mecanismo regulador natural puede controlar la función de los linfocitos B, la alteración de la función de CD32b provocada por variaciones en la secuencia de proteína de CD32b puede dar lugar a enfermedades autoinmunitarias y este receptor puede estar regulado negativamente en enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, en el caso del SLE. Por lo tanto, son deseables formas alternativas de bloquear la actividad de los linfocitos B ya que ofrecen formas alternativas no naturales de regular la función de BCR. Es probable que estos mecanismos alternativos sean particularmente importantes cuando los mecanismos naturales son disfuncionales en la enfermedad específica.

CD22 es un co-receptor inhibidor del receptor de linfocitos B (BCR) y desempeña un papel crítico para establecer umbrales de señalización para la activación de los linfocitos B. El uso como diana de CD22 induce tanto la regulación física negativa de los componentes del complejo de BCR en las células en reposo, lo que podría dar probablemente como resultado linfocitos B con menor respuesta, así como la limitación del alcance de la señalización de BCR después del acoplamiento de BCR. El efecto general es la inhibición de la activación de los linfocitos B, lo que en última instancia reduce los consiguientes acontecimientos autoinmunitarios e inflamatorios mediados por los linfocitos B. Por lo tanto, la modulación mediante anticuerpos de la función de CD22 puede tener un beneficio terapéutico en muchas enfermedades que dependen de la activación de los linfocitos B,

incluyendo la autoinmunidad, la inmunodeficiencia y la aparición de neoplasias malignas (véase, por ejemplo, CD22: an inhibitory enigma. Immunology. 2007. Vol 123: 314-325).

La presente divulgación proporciona una serie de moléculas de anticuerpo específicas para CD22 que pueden emplearse solas o en combinación con una entidad, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específico para un receptor adicional de la superficie de los linfocitos B (tal como CD79), útil para controlar las funciones aberrantes de los linfocitos B, por ejemplo, las asociadas con determinadas enfermedades tales como la autoinmunidad y el cáncer.

Sumario de la divulgación

Por lo tanto, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende:

GX₁X₂FSX₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 1)

en donde X₁ es F, I o L (tal como F), X₂ es S o D, X₃ es S, N o G (tal como S), X₄ es S, Y, L o G, X₅ es Y o está ausente, X₆ es W, Y o D (tal como W o Y, en particular, Y), X₇ es M o I y X₈ es C o S (en particular, S);

CDRH2 de fórmula (II):

X₉IX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆TX₁₇YAX₁₈WAKG (SEQ ID NO: 2)

en donde X₉ es C o S, X₁₀ es Y, D, V o N, X₁₁ es T, P, I, G, S o A, X₁₂ es G, S, o A (en particular, G), X₁₃ es S, I o T, X₁₄ es S, N o está ausente, X₁₅ es G, D, S, A o T, X₁₆ es D, T, S, N, V o G, X₁₇ es Y, D o A y X₁₈ es T o S (en particular, S).

CDHR3 de fórmula (III):

X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃L (SEQ ID NO: 3)

en donde X₁₉ es A o está ausente, X₂₀ está ausente o es G o Y, X₂₁ está ausente o es P o G, X₂₂ está ausente o es Y,

S, D o E, X₂₃ es V, G, Y o W, X₂₄ es G, Y, S o V, X₂₅ es Y, S, G o N, X₂₆ es G, A, S o T, X₂₇ es Y, G o D, X₂₈ es D, I, Y, W o H, X₂₉ es L, G, S, Y o K, X₃₀ es V, Q, C, S, G, T o D, X₃₁ es Y, A o R, X₃₂ es L o F, X₃₃ es N, Y o D (en particular, D);

Y

un dominio variable de cadena ligera que comprende CDRL1, CDRL2 y CDL3 de un lagomorfo, en particular, un dominio variable de cadena ligera que comprende una región marco conservada humana y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de un lagomorfo.

En una realización, CDRL1 tiene la fórmula (IV):

QX₃₄SX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂LX₄₃ (SEQ ID NO: 4)

en donde X₃₄ es A o S (en particular, A), X₃₅ es Q o E (en particular, Q), X₃₆ es S, N o T (en particular, S), X₃₇ es I o V, X₃₈ es S, Y o G (tal como S o Y), X₃₉ es T, S, G o N (tal como S o N), X₄₀ es A, G, N, Y, T o R, X₄₁ está ausente o es N o K (en particular, está ausente), X₄₂ está ausente o es E o D (en particular, está ausente) y X₄₃ es A o S (en particular, A);

CDRL2 tiene la fórmula (V):

X₄₄X₄₅SX₄₆LX₄₇S (SEQ ID NO: 5)

en donde X₄₄ es G, Y, L, A o S, X₄₅ es A, S o T (en particular, A), X₄₆ es T, R o K (en particular, T) y X₄₇ es A o S (en particular, A);

CDRL3 tiene la fórmula (VI):

AGYKSX₄₈X₄₉DX₅₀X₅₁TT (SEQ ID NO: 6)

en donde X₄₈ es D o E (en particular, D), X₄₉ es S, A o T, X₅₀ es D o E (en particular, D) y X₅₁ es G, A o S; o

CDRL3 tiene la fórmula (VII):

QX₅₂X₅₃X₅₄X₅₅X₅₆SX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄ (SEQ ID NO: 7)

en donde X_{52} es S, I o G (tal como S o G), X_{53} es Y, H o G (en particular, Y), X_{54} es Y, D o F (en particular, Y), X_{55} es G, S o Y (tal como S o Y), X_{56} es T, A o S (en particular, S), X_{57} es S, G, V o D, X_{58} es G, S, L o está ausente, X_{59} es G, R, S o N, X_{60} es S, D o V (tal como S o D), X_{61} es W, Y o está ausente (tal como W o Y), X_{62} es A, T, G o está ausente, X_{63} es N o está ausente (en particular, está ausente), X_{64} es A o está ausente (en particular, está ausente).

10 En una realización, la secuencia de fórmula (I) es como se muestra en la fórmula (Ia):

$GX_1X_2FSX_3X_4X_5YX_7X_8$ (SEQ ID NO: 8)

e donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_7 y X_8 son como se han descrito anteriormente para la fórmula I, en particular, es
15 una secuencia de fórmula (Ib):

$GX_1X_2FSX_3X_4X_5YX_7S$ (SEQ ID NO: 9)

en donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_7 son como se han definido anteriormente para la fórmula I.

En una realización, la secuencia de fórmula (II) es
20 como se muestra en la fórmula (IIa):

$X_9IX_{10}X_{11}GX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}TX_{17}YAX_{18}WAKG$ (SEQ ID NO: 10)

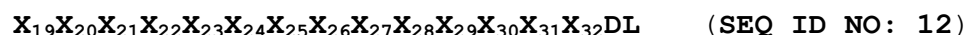
en donde X_9 , X_{10} , X_{11} , X_{13} , X_{14} , X_{15} , X_{16} , X_{17} y X_{18} son como se han definido anteriormente para la fórmula II.

En una realización, la secuencia de fórmula (II) es
25 como se muestra en la fórmula (IIb):

$X_9IX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}TX_{17}YASWAKG$ (SEQ ID NO: 11)

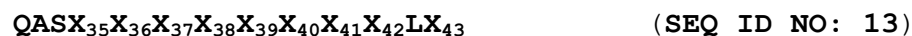
en donde X_9 , X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , X_{15} , X_{16} y X_{17} son como se han definido anteriormente para la fórmula II, en particular, una secuencia de fórmula (IIb) en donde X_{12} es
30 G.

En una realización, la secuencia de fórmula (III) es como se muestra en la fórmula (IIIa):

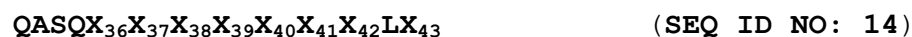


en donde X_{19} , X_{20} , X_{21} , X_{22} , X_{23} , X_{24} , X_{25} , X_{26} , X_{27} , X_{28} ,
5 X_{29} , X_{30} , X_{31} y X_{32} son como se han definido anteriormente para la fórmula III.

En una realización, la secuencia de fórmula (IV) es como se muestra en la fórmula (IVa):



10 en donde X_{35} , X_{36} , X_{37} , X_{38} , X_{39} , X_{40} , X_{41} , X_{42} y X_{43} son como se han definido anteriormente para la fórmula IV; en particular, es una secuencia de fórmula (IVb):



en donde X_{36} , X_{37} , X_{38} , X_{39} , X_{40} , X_{41} , X_{42} y X_{43} son como se
15 han definido anteriormente para la fórmula IV; en particular, es una secuencia de fórmula (IVc):



en donde X_{37} , X_{38} , X_{39} , X_{40} , X_{41} , X_{42} y X_{43} son como se han
definido anteriormente para la fórmula IV; en particular,
20 es una secuencia de fórmula (IVd):



en donde X_{37} , X_{38} , X_{39} , X_{40} , X_{42} y X_{43} son como se han
definido anteriormente para la fórmula IV; en particular,
es una secuencia de fórmula (IVe):



en donde X_{37} , X_{38} , X_{39} , X_{40} , y X_{43} son como se han definido
anteriormente para la fórmula IV; en particular, es una
secuencia de fórmula (IVf):



30 en donde X_{37} , X_{38} , X_{39} y X_{40} son como se han definido anteriormente para la fórmula IV.

En una realización, la secuencia de fórmula (V) es como se muestra en la fórmula (Va):

X₄₄ASX₄₆LX₄₇S (SEQ ID NO: 19)

5 en donde X₄₄, X₄₆ y X₄₇ son como se han definido anteriormente para la fórmula V; en particular, es una secuencia de fórmula (Vb):

X₄₄ASX₄₆LAS (SEQ ID NO: 20)

10 en donde X₄₄ y X₄₆ son como se han definido anteriormente para la fórmula V; en particular, es una secuencia de fórmula (Vc):

X₄₄ASTLAS (SEQ ID NO: 21)

en donde X₄₄ es como se ha definido anteriormente para la fórmula V.

15 En una realización, la secuencia de fórmula (VI) es como se muestra en la fórmula (VIa):

AGYKSX₄₈X₄₉DX₅₀X₅₁TT (SEQ ID NO: 22)

en donde X₄₈, X₄₉, X₅₀ y X₅₁ son como se han definido anteriormente para la fórmula VI; en particular, es una secuencia de fórmula (VIb):

20 **AGYKSDX₄₉DDX₅₁TT** (SEQ ID NO: 23)

en donde X₄₉ y X₅₁ son como se han definido anteriormente para la fórmula VI.

En una realización, la secuencia de fórmula (VII) es como se muestra en la fórmula (VIIa):

25 **QX₅₂YX₅₄X₅₅X₅₆SX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄** (SEQ ID NO: 24)

en donde X₅₂, X₅₄, X₅₅, X₅₆, X₅₇, X₅₈, X₅₉, X₆₀, X₆₁, X₆₂, X₆₃ y X₆₄ son como se han definido anteriormente para la fórmula VII; en particular, es una secuencia de fórmula (VIIb):

30 **QX₅₂YYX₅₅X₅₆SX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄** (SEQ ID NO: 25)

en donde X_{52} , X_{55} , X_{56} , X_{57} , X_{58} , X_{59} , X_{60} , X_{61} , X_{62} , X_{63} y X_{64} son como se han definido anteriormente para la fórmula VII; en particular, es una secuencia de fórmula (VIIc):

$QX_{52}YYX_{55}SSX_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}$ (SEQ ID NO: 26)

5 en donde X_{52} , X_{55} , X_{57} , X_{58} , X_{59} , X_{60} , X_{61} , X_{62} , X_{63} y X_{64} son como se han definido anteriormente para la fórmula VII; en particular, es una secuencia de fórmula (VIId):

$QX_{52}YYX_{55}SSX_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{64}$ (SEQ ID NO: 27)

10 en donde X_{52} , X_{55} , X_{57} , X_{58} , X_{59} , X_{60} , X_{61} , X_{62} y X_{64} son como se han definido anteriormente para la fórmula VII; en particular, es una secuencia de fórmula (VIIe):

$QX_{52}YYX_{55}SSX_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}$ (SEQ ID NO: 28)

15 en donde X_{52} , X_{55} , X_{57} , X_{58} , X_{59} , X_{60} , X_{61} y X_{62} son como se han definido anteriormente para la fórmula VII.

A continuación se proporcionan ejemplos de CDR que se encuentran dentro de la definición de la fórmula (I), (II) y (III):

SEQ ID NO: 29 GFSFSSSYMC (por ejemplo, como CDRH1)

20 **SEQ ID NO: 30** GFSFSSSYMS (por ejemplo, como CDRH1)

SEQ ID NO: 31 GIDFSSYYMC (por ejemplo, como CDRH1)

25 **SEQ ID NO: 32** GIDFSSYYMS (por ejemplo, como CDRH1)

SEQ ID NO: 33 GFSFSNLYMC (por ejemplo, como CDRH1)

SEQ ID NO: 34 GFSFSNLYMS (por ejemplo, como CDRH1)

30 **SEQ ID NO: 35** GLDFSSYWIC (por ejemplo, como CDRH1)

	SEQ ID NO: 36	GLDFSSYWIS (por ejemplo, como CDRH1)
	SEQ ID NO: 37	GFDFSGGYDIS (por ejemplo, como CDRH1)
5	SEQ ID NO: 38	GFSFSSSYWIC (por ejemplo, como CDRH1)
	SEQ ID NO: 39	GFSFSSSYWIS (por ejemplo, como CDRH1)
	SEQ ID NO: 40	CIYTGSSGDTYYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
10	SEQ ID NO: 41	SIYTGSSGDTYYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
	SEQ ID NO: 42	CIDPASSGTTYATWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
15	SEQ ID NO: 43	SIDPASSGTTYATWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
	SEQ ID NO: 44	CIDISSSGSTYYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
	SEQ ID NO: 45	SIDISSSGSTYYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
20	SEQ ID NO: 46	CIVTGSSDNTYYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
	SEQ ID NO: 47	SIVTGSSDNTYYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
25	SEQ ID NO: 48	CIYGGINSVTDYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
	SEQ ID NO: 49	CIYGGINAVTDYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)
30	SEQ ID NO: 50	CIYGGINTVTDYASWAKG (por ejemplo, como CDRH2)

	SEQ ID NO: 51	SIYGGINSVTDYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
	SEQ ID NO: 52	SIYGGINAVTDYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
5	SEQ ID NO: 53	SIYGGINTVTDYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
	SEQ ID NO: 54	CINSGTGGTAYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
	SEQ ID NO: 55	CINAGTGGTAYASWAKG (por ejemplo,
10	como CDRH2)	
	SEQ ID NO: 56	CINTGTGGTAYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
	SEQ ID NO: 57	SINSGTGGTAYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
15	SEQ ID NO: 58	SINAGTGGTAYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
	SEQ ID NO: 59	SINTGTGGTAYASWAKG (por ejemplo,
	como CDRH2)	
	SEQ ID NO: 60	GPYVGYG YDLQYLYL (por ejemplo,
20	como CDRH3)	
	SEQ ID NO: 61	AYGSGSGYIGCYFDL (por ejemplo,
	como CDRH3)	
	SEQ ID NO: 62	AYGSGSGYIGSYFDL (por ejemplo,
	como CDRH3)	
25	SEQ ID NO: 63	DYYSSDWGVRFNL (por ejemplo, como
		CDRH3)
	SEQ ID NO: 64	GGGAGYSGAFDL (por ejemplo, como
		CDRH3)
	SEQ ID NO: 65	DVSNSDHYTRLDL (por ejemplo, como
30	CDRH3)	

SEQ ID NO: 66 DVSNADHYTRLDL (por ejemplo, como CDRH3)

SEQ ID NO: 67 DVSNTDHYTRLDL (por ejemplo, como CDRH3)

5 **SEQ ID NO: 68** EWVSGYYKDAFDL (por ejemplo, como CDRH3)

A continuación se proporcionan ejemplos de CDR que se encuentran dentro de la definición de la fórmula (IV), (V), (VI) y (VII):

10 **SEQ ID NO: 69** QASQSISTALA (por ejemplo, como CDRL1)

SEQ ID NO: 70 QASQNIGSGLA (por ejemplo, como CDRL1 variante 1)

15 **SEQ ID NO: 71** QASQSVYGNNELS (por ejemplo, como CDRL1 variante 2)

SEQ ID NO: 72 QASESISNYLS (por ejemplo, como CDRL1 variante 3)

SEQ ID NO: 73 QSSQSVYNTKDLA (por ejemplo, como CDRL1 variante 4)

20 **SEQ ID NO: 74** QASETISSRLA (por ejemplo, como CDRL1 variante 5)

SEQ ID NO: 75 GASTLAS (por ejemplo, como CDRL2)

SEQ ID NO: 76 YASTLAS (por ejemplo, como CDRL2 variante 1)

25 **SEQ ID NO: 77** LASRLAS (por ejemplo, como CDRL2 variante 2)

SEQ ID NO: 78 ASSKLSS (por ejemplo, como CDRL2 variante 3)

30 **SEQ ID NO: 79** GTSTLAS (por ejemplo, como CDRL2 variante 4)

	SEQ ID NO: 80	SASTLAS (por ejemplo, como CDRL2 variante 5)
	SEQ ID NO: 81	QSYYGTS SGGSWA (por ejemplo, como CDRL3)
5	SEQ ID NO: 82	QSHDYSSVRSYGNA (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 83	AGYKSDSDDGTT (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 84	AGYKSESDDGTT (por ejemplo, como CDRL3)
10	SEQ ID NO: 85	AGYKSDADDGTT (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 86	AGYKSDTDDGTT (por ejemplo, como CDRL3)
15	SEQ ID NO: 87	AGYKSDSDEGTT (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 88	AGYKSDSDDATT (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 89	AGYKSDSDDSTT (por ejemplo, como CDRL3)
20	SEQ ID NO: 90	AGYKSESDEGTT (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 91	AGYKSESDDATT (por ejemplo, como CDRL3)
25	SEQ ID NO: 92	AGYKSESDDSTT (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 93	AGYKSDADEGTT (por ejemplo, como CDRL3)
	SEQ ID NO: 94	AGYKSDADDATT (por ejemplo, como CDRL3)
30		

SEQ ID NO: 95 AGYKSDADDSTT (por ejemplo, como CDRL3)

SEQ ID NO: 96 AGYKSDTDEGTT (por ejemplo, como CDRL3)

5 **SEQ ID NO: 97** AGYKSDTDDATT (por ejemplo, como CDRL3)

SEQ ID NO: 98 AGYKSDTDDSTT (por ejemplo, como CDRL3)

10 **SEQ ID NO: 99** QIYYASGSRDWT (por ejemplo, como CDRL3)

SEQ ID NO: 100 QGGFSSSDLNV (por ejemplo, como CDRL3)

SEQ ID NO: 101 QGYYYSSGSDYG (por ejemplo, como CDRL3)

15 En un ejemplo, la presente invención proporciona los anticuerpos para CD22 descritos en el presente documento en un formato de anticuerpo adecuado. Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD22 o fragmentos de los mismos que contienen uno o
20 más de los dominios de unión descritos en el presente documento que comprenden las CDR proporcionadas anteriormente en el presente documento y en la figura 35 que incluyen aquellas CDR de conejo procedentes de los siguientes anticuerpos, el anticuerpo 4120, el anticuerpo
25 4126, el anticuerpo 4127, el anticuerpo 4128, el anticuerpo 4130 o el anticuerpo 4132. Dichas CDR pueden incorporarse en cualquier armazón de anticuerpo y en cualquier formato de anticuerpo adecuado. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos completos y fragmentos funcionalmente activos o
30 derivados de los mismos que pueden ser, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, humanizados, completamente

humanos o quiméricos. Por consiguiente, dichos anticuerpos pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas o ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas y pueden ser, pero sin limitación

5 Fab, Fab modificados, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de un solo dominio, scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diabodies, triabodies, tetrabodies y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech.

10 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Los anticuerpos

15 multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/22853 y WO05/113605). Se apreciará que este aspecto de la invención también se extiende a variantes de estos anticuerpos anti-CD22, incluyendo

20 versiones humanizadas y versiones modificadas, incluyendo aquellas en las que se han mutado los aminoácidos en las CDR para eliminar uno o más sitios de isomerización, desamidación o glucosilación o restos de cisteína, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. T

25 Por lo tanto, en un ejemplo se proporciona una molécula de anticuerpo anti-CD22 de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo) que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha

30 región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 1, 8 o 9, las SEQ

ID NO: 2, 10 u 11 y las SEQ ID NO: 3 o 12, por ejemplo, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 1, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 2 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 3.

Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es las SEQ ID NO: 1, 8 o 9 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 2; o la CDR H1 es las SEQ ID NO: 1, 8 o 9 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 10; la CDR H1 es las SEQ ID NO: 1, 8 o 9 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 11; o la CDR H1 es las SEQ ID NO: 1, 8 o 9 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 3; o la CDR H1 es las SEQ ID NO: 1, 8 o 9 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 12; o la CDR H2 es las SEQ ID NO: 2, 10 o 11 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 3; o la CDR H2 es las SEQ ID NO: 2, 10 o 11 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 12.

En un ejemplo, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 29-68, en particular, en donde la CDR H1 tiene la secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 29-39, la CDR H2 tiene la secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 40-59 y la CDR H3 tiene la secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 60-68.

En un ejemplo se proporciona una molécula de anticuerpo anti-CD22 de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo) que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 29, 30, 40, 41 y 60,

por ejemplo, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 o 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 o 41 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60.

Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 o 30 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 o 41; o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 o 30 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60; o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 o 41 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60.

Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40; o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60; o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60

En otra realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 30 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 41 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 30 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 41 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60.

En otra realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 41.

En un ejemplo se proporciona una molécula de anticuerpo anti-CD22 de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo) que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 31, 32, 42, 43, 61 y 62, por ejemplo, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 o 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62.

Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 o 32 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43; o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 o 32 y la CDR H3 es la SEQ ID NO:

61 o 62; o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62. Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61. En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61. En otra realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61. En otra realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62.

En un ejemplo se proporciona una molécula de anticuerpo anti-CD22 de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo) que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 33, 34, 44, 45 y 63, por ejemplo, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63.

Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63. Por lo tanto, en una realización, la CDR H1

es la SEQ ID NO: 33 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63. En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63.

En otra realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63. En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45.

En un ejemplo se proporciona una molécula de anticuerpo anti-CD22 de acuerdo con la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo) que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 35, 36, 46, 47 y 64, por ejemplo, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 o 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o 47 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64.

Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 o 36 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o 47 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 o 36 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o 47 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64. Por lo tanto, en una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 47 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 36 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 47 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64. En otra realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 36 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 36 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 47.

En un ejemplo se proporciona una molécula de anticuerpo anti-CD22 de acuerdo con la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo) que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 37, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 65, 66 y 67, por ejemplo, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 o 53, y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 o 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67.

Por lo tanto, en una realización:

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53 o

5 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66 o

10 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En una realización, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65.

Por lo tanto, en una realización:

15 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

20 En una realización:

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66 o

25 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En otra realización:

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65 o

30 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En otra realización:

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En otra realización:

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En otra realización:

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67.

30 En un ejemplo se proporciona una molécula de anticuerpo anti-CD22 de la presente divulgación (por

ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo) que comprende una cadena pesada o un fragmento de cadena pesada que tiene una región variable, en donde dicha región variable comprende una, dos o tres CDR seleccionadas
5 independientemente entre las SEQ ID NO: 38, 39, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 68, por ejemplo, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 o 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 o 59 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 o 39
10 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 o la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 o 39 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68 o la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

En una realización:
15 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 55 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID
20 NO: 56 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 57 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 58 o

25 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 59.

En una realización:

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 68.

30 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 55 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 56 o

5 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 57 o

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 58 o

10 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 59.

En una realización:

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 68.

En una realización:

15 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54 y la CDRH3 es la SEQ ID NO: 68 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 55 y la CDRH3 es la SEQ ID NO: 68 o

20 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 56 y la CDRH3 es la SEQ ID NO: 68 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 57 y la CDRH3 es la SEQ ID NO: 68 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 58 y la CDRH3 es la SEQ ID NO: 68 o

25 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 59 y la CDRH3 es la SEQ ID NO: 68.

En una realización:

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

30 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 55 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 56 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 57 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

5 la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 58 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 y la CDR H2 es la SEQ ID NO: 59 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

10 En una realización, se emplea una región variable de cadena pesada listada anteriormente en combinación con una región variable de cadena ligera listada en el presente documento.

15 En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende además una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 69-101, en particular, en donde la CDR L1 tiene la secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 69-74,
20 la CDR L2 tiene la secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 75-80 y la CDR L3 tiene la secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 81-101.

25 En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 69, 75 y 81, en particular, en donde la CDR L1 tiene la
30 secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 69, la CDR L2

tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 81.

Por lo tanto, en una realización, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69 y la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 o la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81; o la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 70, 76 y 82, en particular, en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 82.

Por lo tanto, en una realización, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70 y la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76; o la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82; o la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 71, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 y 98, en particular, en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 y 98.

Por lo tanto, en una realización, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77; o la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98; o la
5 CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

En una realización:

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 83 o
10 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 84 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 85 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID
15 NO: 86 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 87 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 88 o
20 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 89 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 90 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID
25 NO: 91 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 92 o
la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 93 o
30 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 94 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 95 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 96 o

5 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 97 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 98.

En una realización:

10 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 83 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 84 o

15 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 85 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 86 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 87 o

20 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 88 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 89 o

25 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 90 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 91 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 92 o

30 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 93 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 94 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 95 o

5 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 96 o

la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 97 o

10 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 98.

En una realización:

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 83 o

15 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 84 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 85 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 86 o

20 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 87 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 88 o

25 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 89 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 90 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 91 o

30 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 92 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 93 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 94 o

5 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 95 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 96 o

10 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 97 o

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 98.

En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 72, 78 y 99, en particular, en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 99.

Por lo tanto, en una realización, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72 y la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78; o la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99; o la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 73, 79 y 100, en particular, en donde la CDR L1 tiene la

secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 100.

5 Por lo tanto, en una realización, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73 y la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79; o la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100 o la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

10 En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación comprende una cadena ligera o un fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, por ejemplo, que comprende una, dos o tres CDR seleccionadas independientemente entre las SEQ ID NO: 74, 80 y 101, en particular, en donde la CDR L1 tiene la
15 secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 101.

20 Por lo tanto, en una realización, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74 y la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 o la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101 o la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

25 En un ejemplo, las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación (tales como anticuerpos o fragmentos de unión) comprenden secuencias de CDR seleccionadas entre las SEQ ID NO: 29-101, por ejemplo, en donde la CDR H1 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 29-39, la CDR H2 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 40-59, la CDR H3 se
30 selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 60-68, la CDR L1 se selecciona independientemente entre las SEQ ID

NO: 69-74, la CDR L2 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 75-80 y la CDR L3 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 81-101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 o 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 o 41, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 o 41, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 o 41, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 o 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 o 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 41, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 41, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 41, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 o 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43 o la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO:

62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43 o la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 43, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 62, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO:

63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34,
5 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la
10 CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34,
15 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34,
20 la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la
25 CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34,
la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO:
30 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 83.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 84.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 84.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 84.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 84.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO:

63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 84.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 85.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 85.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 85.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 85.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 85.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 86.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 86.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 86.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 86.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 86.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 87.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 87.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 87.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 87.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO:

63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 87.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 88.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 88.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 88.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 88.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 88.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 89.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 89.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 89.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 89.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 89.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 90.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 90.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 90.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 90.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO:

63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 90.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 91.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 91.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 91.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 91.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 91.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 92.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 92.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 92.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 92.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 92.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 93.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 93.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 93.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 93.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO:

63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 93.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 94.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 94.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 94.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 94.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 94.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 95.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 95.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 95.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 95.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 95.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 96.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 96.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 96.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 96.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO:

63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 96.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 97.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 97.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 97.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 97.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 97.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 98.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 98.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 98.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 98.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 45, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es las SEQ ID NO: 98.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 o 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o 47, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o 47, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o 47, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 o 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 o 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 47, la CDR H3 es la SEQ ID

NO: 64, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64,
5 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO:
10 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 47, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 o 53, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la
25 CDR H2 es la SEQ ID NO: 49, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65,
30 66 o 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65,

la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65,
5 la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.
10

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.
15

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.
20

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.
25

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 66, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.
30

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 49, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 50, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 51, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 675, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 52, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 53, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 67, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 100.

25 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 o 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 o 59, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

30 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 o 59, la CDR H3

es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 o 59, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101. En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 55, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 55, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 56, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 56, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 57, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

5 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 57, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

10 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 58, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

15 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 58, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

20 En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 59, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

En una realización, la CDR H1 es la SEQ ID NO: 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 59, la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68, la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

25 En un aspecto independiente, la presente divulgación proporciona un dominio variable pesado que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 62, 71, 80, 90 y una secuencia al menos un 95% idéntica o similar (tal como un 96, 97, 98, 99% idéntica o similar) a una cualquiera de las mismas.

30 En un aspecto independiente, se proporciona una región ligera variable que comprende una secuencia de las SEQ ID

NO: 102, 111, 122, 131, 140 y una secuencia al menos un 95% idéntica o similar (tal como un 96, 97, 98, 99% idéntica o similar) a una cualquiera de las mismas.

En un aspecto independiente, la presente divulgación
5 proporciona un dominio variable pesado que comprende la
secuencia de las SEQ ID NO: 104, 113, 124, 133, 142, una
secuencia al menos un 95% idéntica o similar (tal como un
96, 97, 98, 99% idéntica o similar) a una cualquiera de las
mismas y una región variable ligera que comprende una
10 secuencia de las SEQ ID NO: 60, 69, 78, 88 y una secuencia
al menos un 95% idéntica o similar (tal como un 96, 97, 98,
99% idéntica o similar) a una cualquiera de las mismas.

En una realización, los pares de VH y VL se
seleccionan entre:

- 15 • SEQ ID NO: 102 o una secuencia al menos un 95%
idéntica o similar a la misma y la SEQ ID NO: 104 o una
secuencia al menos un 95% idéntica o similar a la misma,
- SEQ ID NO: 111 o una secuencia al menos un 95%
idéntica o similar a la misma y la SEQ ID NO: 113 o una
20 secuencia al menos un 95% idéntica o similar a la misma,
- SEQ ID NO: 122 o una secuencia al menos un 95%
idéntica o similar a la misma y la SEQ ID NO: 124 o una
secuencia al menos un 95% idéntica o similar a la misma y
- 25 • SEQ ID NO: 131 o una secuencia al menos un 95%
idéntica o similar a la misma y la SEQ ID NO: 133 o una
secuencia al menos un 95% idéntica o similar a la misma.
- SEQ ID NO: 140 o una secuencia al menos un 95%
idéntica o similar a la misma y la SEQ ID NO: 142 o una
30 secuencia al menos un 95% idéntica o similar a la misma.

En una realización, se proporciona una versión humanizada de un dominio variable no humano divulgado en el presente documento.

En el presente documento se emplea la numeración de Kabat, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En una realización, se humaniza una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación e incorpora una o más de las CDR descritas en el presente documento o variantes de las mismas.

En una realización, el armazón humano de región variable de cadena pesada empleado en la construcción, tal como una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, se selecciona entre el grupo que comprende IGHV3-7, IGHV3-9, IGHV3-21, IGHV3-33, IGHV3-66, IGHV4-38-2, IGHV4-4, IGHV4-59 y una variante de una cualquiera de las mismas en donde se sustituyen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos por un aminoácido distinto de cisteína, por ejemplo, se sustituye con un resto donante en la ubicación correspondiente en el anticuerpo donante de lagomorfo original. Véanse, por ejemplo, las secuencias de anticuerpo donante de conejo proporcionadas en el presente documento.

En una realización, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación está humanizada.

Típicamente, el armazón humano comprende además una secuencia de región J adecuada, tal como la región J JH4 o JH2.

En una realización, un armazón de VH humano empleado en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación comprende una sustitución de aminoácidos en al menos una

posición seleccionada entre el grupo que comprende 11, 23, 24, 37, 47, 48, 49, 67, 71, 73, 76, 78 y 94, por ejemplo, en donde el aminoácido original en el armazón humano se sustituye por otro aminoácido distinto de cisteína, en particular, se sustituye por un resto en la ubicación correspondiente en el armazón del anticuerpo donante.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 73 y 76.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 73, 76 y 78.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 67, 73, 76 y 78.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 48, 67, 73, 76 y 78.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 24, 48, 67, 73, 76 y 78.

En una realización, cuando el armazón de VH es de tipo IGHV3, pueden efectuarse sustituciones al menos en una posición, al menos dos posiciones, al menos tres posiciones o al menos cuatro posiciones (normalmente cinco o seis posiciones) seleccionadas entre 11, 23, 24, 47, 48, 49, 67, 71, 73, 76, 78 y 94, tal como 71, 73, 76 y 78 (en particular, adecuadas para IGHV3-7) o 47, 48, 49, 71, 73, 76, 78 y 94 (en particular, adecuadas para IGHV3-9) o 48, 49, 71, 73, 76 y 78 (en particular, adecuadas para IGHV3-21) u 11, (opcionalmente, 23 y 24) 48, 71, 73, 76 y 78 (en particular, adecuadas para IGHV3-33) o 48, 49, 67, 71, 73, 76 y 78 (en particular, adecuadas para IGHV3-66).

En una realización, cuando el armazón de VH es de tipo IGHV4, pueden efectuarse sustituciones en al menos una posición, al menos dos posiciones, al menos tres posiciones,

al menos cuatro posiciones, cinco o más posiciones, tal como 6 seleccionadas entre 23, 24, 37, 47, 48, 49, 67, 71, 73, 76 y 78, tal como 24, 37, (opcionalmente, 47), (opcionalmente, 49), 67, 71, 73, 76 y 78 (en particular, adecuadas para IGHV4-38-2) o 24, (opcionalmente, 48), (opcionalmente, 49), (opcionalmente, 67), 71, 73, 76 y 78 (en particular, adecuadas para IGHV4-4) o 23, 24, 37, 49, 67, 71, 73, 76 y 78 (en particular, adecuadas para IGHV4-59).

10 En una realización, después de la sustitución, la posición 11 es leucina.

 En una realización, después de la sustitución, la posición 23 es lisina.

15 En una realización, después de la sustitución, la posición 24 es glicina.

 En una realización, después de la sustitución, la posición 37 es valina.

 En una realización, después de la sustitución, la posición 47 es leucina.

20 En una realización, después de la sustitución, la posición 48 es serina.

 En una realización, después de la sustitución, la posición 49 es glicina.

25 En una realización, después de la sustitución, la posición 67 es fenilalanina o valina.

 En una realización, después de la sustitución, la posición 71 es lisina o asparagina.

 En una realización, después de la sustitución, la posición 73 es serina.

30 En una realización, después de la sustitución, 76 es treonina.

En una realización, después de la sustitución, 78 es valina.

En una realización, después de la sustitución, 94 es arginina.

5 En una realización en donde el armazón de VH humano es glutamina en la posición 1 del armazón humano, se reemplaza la glutamina por ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo: se ha
10 comunicado ampliamente la conversión de glutamina a piroglutamato en el extremo N-terminal de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

Se apreciará que pueden combinarse una o más de estas sustituciones para generar una región VH humanizada para su uso en una molécula de anticuerpo de la invención.

15 En un aspecto independiente de la invención, se proporciona un dominio variable VH humanizado que comprende cualquier secuencia adecuada divulgada en el presente documento, por ejemplo, que comprende una secuencia
20 seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 107, 108, 109, 110, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 127, 128, 129, 130, 136, 137, 138, 139, 145, 146, 147, 148, 154, 155, 156, 157 y una secuencia al menos un 80%, 85%, 90%, 95% idéntica o similar a las mismas (tal como un 96, 97, 98 o 99% similar o idéntica).

25 En una realización, el dominio variable de VH humanizado comprende cualquier secuencia adecuada divulgada en el presente documento, por ejemplo, que comprende una secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID
30 NO: 107, 108, 109, 110, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 127, 128, 129, 130, 136, 137, 138, 139, 145, 146, 147, 148, 154, 155, 156 y 157.

En una realización, el armazón humano de la región variable de cadena ligera empleado en la molécula de anticuerpo humanizada de la presente divulgación se selecciona entre el grupo que comprende IGKV1-5, IGKV1-9, IGKV1D-13 y una variante de una cualquiera de las mismas, en donde se sustituyen uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos por un aminoácido distinto de cisteína, por ejemplo, se sustituye por un resto donante en la ubicación correspondiente en el anticuerpo donante de lagomorfo original. Véanse, por ejemplo, las secuencias de anticuerpo de conejo proporcionadas en el presente documento. Típicamente, el armazón humano comprende además una región J adecuada, tal como una región J JK4.

En una realización, un armazón de VL humano empleado en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación comprende una sustitución de aminoácidos en al menos una posición seleccionada entre el grupo que comprende 1, 2, 3, 36, 63, 65, 66, 70, y 71, por ejemplo, en donde el aminoácido original en el armazón se sustituye por otro aminoácido distinto de cisteína, en particular, se sustituye por un resto en la ubicación correspondiente en el armazón del anticuerpo donante.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 3 y 70.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 3 y 71.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 2, 3 y 70.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 1, 3 y 71.

En una realización, se efectúan sustituciones en al menos las posiciones 1, 3, 70 y 71.

En una realización, cuando se emplea un armazón humano IGKV1-5, pueden efectuarse una o más sustituciones en la
5 posición 1, 3, 36, 63, 65, 66, 70 y 71, por ejemplo, 3 y 70 o 3 y 71 o 1, 3 y 70 o 3, 36, 63, 65, 66 y 71.

En una realización, cuando se emplea un armazón humano IGKV1-9, pueden efectuarse una o más, dos o más o tres o
10 más sustituciones en las posiciones seleccionadas independientemente entre 1, 2 y 3.

En una realización, cuando se emplea un armazón humano IGKV1D-13, pueden efectuarse una o dos o tres sustituciones en las posiciones seleccionadas independientemente entre 2 y 3.

15 En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 1 es alanina.

En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 2 es fenilalanina o alanina.

20 En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 3 es valina o ácido glutámico.

En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 36 es fenilalanina.

En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 63 es lisina.

25 En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 65 es ácido aspártico.

En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 66 es arginina.

30 En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 70 es glutamina.

En una realización, después de la sustitución en el armazón de VL, la posición 71 es tirosina.

Se apreciará que pueden combinarse una o más de estas sustituciones para generar una región VL humanizada para su
5 uso en una molécula de anticuerpo de la invención.

En un aspecto independiente, se proporciona un dominio variable VL humanizado que comprende una secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 106, 115, 126, 135, 144, 153 y una secuencia al menos un 80%,
10 85%, 90%, 95% idéntica o similar a las mismas (tal como un 96, 97, 98 o 99% similar o idéntica).

En una realización, el dominio variable VL humanizado comprende una secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 106, 115, 126, 135, 144 y 153.

15 En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 107, 108, 109, 110 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 106.

20 En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 y 121 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 115.

25 En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 127, 128, 129, 130 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 126.

30 En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 136, 137, 138, 139 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 135.

En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 145, 146, 147, 148 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 144.

5 En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 154, 155, 156, 157 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 153.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo de longitud completa.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un fragmento Fab o Fab'.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un scFv.

15 En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es multiespecífica, por ejemplo, biespecífica o triespecífica.

En una realización, la molécula de anticuerpo multiespecífica (tal como una molécula de anticuerpo biespecífica) de la divulgación, además de un dominio de unión específico para CD22 comprende un dominio de unión específico para CD79, por ejemplo, comprendiendo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR anti-CD79 divulgadas en el presente documento o variantes de las mismas, tales como un dominio variable o un par de dominio variable, en particular, un dominio variable o par de dominios variables humanizados divulgados en el presente documento.

La combinación de acuerdo con la presente divulgación en un formato multiespecífico (tal como biespecífico) muestra una actividad biológica interesante en ensayos funcionales *in vitro*, por ejemplo, inhibición de la

señalización de linfocitos B medida mediante uno cualquiera de los siguientes: inhibición de la fosforilación de Akt S473, inhibición de la fosforilación de P38 y PLCγ2 Y759, inhibición de IκB, además de la inhibición de la expresión de CD86, CD71 y/o CD40 en linfocitos B. No es evidente el mismo nivel de actividad para componentes individuales solos o los componentes proporcionados en una mezcla. Sin embargo, es evidente la actividad cuando se proporciona una construcción biespecífica con especificidad por CD22 y CD79.

La inhibición de determinadas funciones de los linfocitos B observada en estos ensayos indica que puede emplearse una molécula multiespecífica de la invención, que comprende un dominio de unión específico para CD22 y un dominio de unión específico para CD79, para alterar la función de los linfocitos B y por ejemplo, para proporcionar una alternativa terapéutica a la eliminación de linfocitos B.

En una realización, el dominio de unión o los dominios de unión de las moléculas biespecíficas de la presente invención comprenden cada una independientemente uno o dos (tal como dos) dominios variables de anticuerpo específicos para un antígeno relevante (tal como al menos un dominio de unión específico para CD22 y un dominio de unión adicional específico para CD79 o un antígeno adicional en caso de que la molécula sea al menos triespecífica).

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente divulgación es específica para CD22.

En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD79a.

En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD79b.

5 En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para el complejo de CD79, es decir, reconoce un epítipo presente en el complejo y es específico para el mismo, por ejemplo, un epítipo que comprende una interacción entre CD79a y CD79b.

10 En una realización, incluso en los casos donde el dominio de unión es específico para CD79a o CD79b, se apreciará que el dominio de unión seguirá uniéndose a CD79a o CD79b cuando se encuentra en forma de complejo.

15 En los casos donde hay dos regiones variables en un dominio de unión o en cada dominio de unión, las dos regiones variables funcionarán de manera cooperativa para proporcionar especificidad por el antígeno relevante, por ejemplo, son un par afín o madurado por afinidad, para proporcionar una afinidad adecuada de tal forma que el
20 dominio es específico para un antígeno particular. Típicamente, son un par de región variable de cadena pesada y ligera (par de VH/VL).

En una realización, la molécula de la presente divulgación es biespecífica.

25 En una realización, la molécula de la presente divulgación es triespecífica, por ejemplo, en los casos donde el tercer dominio de unión es específico para albúmina sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana.

30 En una realización, la molécula de la presente divulgación es monoespecífica para CD79 y CD22, es decir,

la molécula comprende únicamente un dominio de unión que se une a CD79 y un dominio de unión que se une a CD22.

En una realización, la molécula multiespecífica de la presente divulgación es una sola cadena.

5 En una realización, la molécula multiespecífica de la presente divulgación comprende una cadena pesada y también una cadena ligera. En un ejemplo, tal como se emplea en el presente documento, un emparejamiento de cadena pesada y ligera no se cita como un dímero, en particular en el caso
10 de una realización donde la molécula de la presente divulgación no comprende multímeros, tales como dímeros, unidad/fragmento o componentes del anticuerpo.

En una realización, la molécula comprende no más de un sitio de unión para CD22 y no más de un sitio de unión para
15 CD79.

También se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión que se une al mismo epítipo que un anticuerpo o fragmento de unión divulgado expresamente en el presente documento.

20 En una realización, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión que bloquea de manera cruzada a una molécula de anticuerpo del anticuerpo o fragmento de unión de la presente divulgación divulgado explícitamente en el presente documento para CD22 humano o se bloquea su unión a
25 CD22 humano por medio de dicho anticuerpo.

La divulgación también se extiende a composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de anticuerpo de la presente divulgación.

La presente divulgación también proporciona nuevos
30 anticuerpos para CD22 empleados en cualquier formato de

anticuerpo, incluyendo en una molécula multiespecífica, para su uso en terapia.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar a un paciente que comprende administrar una
5 cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de anticuerpo o de una formulación farmacéutica que comprenda al mismo.

La divulgación también se extiende al uso de la molécula de anticuerpo o de una formulación farmacéutica
10 que comprenda al mismo de acuerdo con la presente divulgación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos divulgados en el presente documento.

La presente divulgación también se extiende a
15 nuevos armazones divulgados en el presente documento, que son adecuados para injertar en los mismos CDR no humanas. Es decir, armazones con cambios de aminoácidos in las CDR correspondientes.

Descripción de los dibujos

20 **Figura 1** es un diagrama de barras de la potencia relativa de la inhibición de Akt fosforilada para combinaciones biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.

Figura 2 es un diagrama de barras de la potencia relativa
25 de la inhibición de PLC γ 2 fosforilada para combinaciones biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.

Figura 3 es un diagrama de barras de la potencia relativa
30 de la inhibición de la expresión de CD86 para combinaciones biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.

- Figura 4** es un diagrama de barras de la potencia relativa de la inhibición de Akt fosforilada para anticuerpos biespecíficos, bivalentes o mezclas de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.
- Figura 5** es un diagrama de barras de la potencia relativa de la inhibición de PLC γ 2 fosforilada para anticuerpos biespecíficos, bivalentes o mezclas de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.
- Figura 6** es una gráfica que muestra la titulación del efecto la combinación biespecífica de CD22 y CD79b en los niveles totales de I κ B en linfocitos B estimulados con anti-IgM.
- Figura 7** es una gráfica que muestra la titulación del efecto la combinación biespecífica de CD22 y CD79b en la expresión de CD86 en linfocitos B estimulados con anti-IgM.
- Figura 8** es una gráfica de la inhibición de PLC γ 2 fosforilada para proteínas biespecíficas con especificidad por CD22 y CD79b con diferentes regiones V.
- Figura 9** es un extracto de Chan y Carter, Nature Reviews Immunology vol 10, mayo de 2010,301 que muestra determinados formatos de anticuerpo
- Figura 10** es una tabla que muestra los datos para las especificidades cruzadas de la matriz de antígenos. Antígeno 2=CD79b y antígeno 3=CD22. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de Syk y representan la media de

múltiples combinaciones de región V evaluadas.

Figura 11 es una tabla que muestra los datos para las especificidades cruzadas de la matriz de antígenos. Antígeno 2=CD79b y antígeno 3=CD22. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de PLCγ2 y representan la media de múltiples combinaciones de región V evaluadas.

Figura 12 es una tabla que muestra los datos para las especificidades cruzadas de la matriz de antígenos. Antígeno 2=CD79b y antígeno 3=CD22. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de AKT y representan la media de múltiples combinaciones de región V evaluadas.

Figura 13 es una gráfica que muestra el porcentaje de inhibición de la fosforilación de Syk, PLCγ2 y AKT para cada combinación de región V para la especificidad para CD79b en Fab-X combinado con especificidad para CD22 en Fab-Y.

Figura 14 es una gráfica que muestra el porcentaje de inhibición de la fosforilación de Syk, PLCγ2 y AKT de la fosforilación de Syk, PLCγ2 y AKT para cada combinación de región V para la especificidad para CD22 en Fab-X combinado con especificidad para CD79b en Fab-Y.

Figura 15 muestra datos para el porcentaje de inhibición de PLCγ2 fosforilada inducida por anti-IgM en linfocitos B mediante Fab-Kd-Fab o BYbe específico para CD79 y CD22.

- Figura 16** muestra datos para el porcentaje de inhibición de P38 fosforilada inducida por anti-IgM en linfocitos B mediante Fab-Kd-Fab o BYbe específico para CD79 y CD22.
- 5 **Figura 17** muestra datos para el porcentaje de inhibición de Akt fosforilada inducida por anti-IgM en linfocitos B mediante Fab-Kd-Fab o BYbe específico para CD79 y CD22.
- 10 **Figura 18** muestra datos para el porcentaje de inhibición de la expresión de CD71 inducida por anti-IgM en linfocitos B mediante Fab-Kd-Fab o BYbe específico para CD79 y CD22.
- 15 **Figura 19** muestra datos para el porcentaje de inhibición de la expresión de CD40 inducida por anti-IgM en linfocitos B mediante Fab-Kd-Fab o BYbe específico para CD79 y CD22.
- 20 **Figura 20** muestra datos para el porcentaje de inhibición de la expresión de CD86 inducida por anti-IgM en linfocitos B mediante Fab-Kd-Fab o BYbe específico para CD79 y CD22.
- Figura 21** muestra la inhibición de la expresión de CD27 en linfocitos B mediante BYbe VR4447/VR4126 y BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina específicos para CD79b y CD22.
- 25 **Figura 22** muestra la inhibición de la expresión de CD71 en linfocitos B mediante BYbe VR4447/VR4126 y BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina específicos para CD79b y CD22.
- 30 **Figura 23** muestra la inhibición de la expresión de CD86 en linfocitos B mediante BYbe VR4447/VR4126 y BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina específicos para

CD79b y CD22.

Figura muestra la inhibición de la expresión de CD27 en
24 linfocitos B mediante BYbe VR4447/VR4130 y BYbe
VR4447/VR4130/VR645/Albúmina específicos para
5 CD79b y CD22.

Figura muestra la inhibición de la expresión de CD71 en
25 linfocitos B mediante BYbe VR4447/VR4130 y BYbe
VR4447/VR4130/VR645/Albúmina específicos para
CD79b y CD22.

10 **Figura** muestra la inhibición de la expresión de CD86 en
26 linfocitos B mediante BYbe VR4447/VR4130 y BYbe
VR4447/VR4130/VR645/Albúmina específicos para
CD79b y CD22.

Figura muestra la inhibición de la producción de IgG
15 **27** para toxoide tetánico por PBMC cultivadas con
BYbe VR4447/VR4126, BYbe VR4447/VR4127 y BYbe
VR4447/VR4130. Los datos representan datos
agrupados de 3 donantes.

Figura muestra la inhibición de la producción de IgG
20 **28** para toxoide tetánico por linfocitos B
purificados cultivados con BYbe VR4447/VR4126,
BYbe VR4447/VR4127 y BYbe VR4447/VR4130. Los
datos representan datos agrupados de 2 donantes.

Figura muestra la inhibición de la producción de IgG
25 **29** para toxoide tetánico por PBMC o linfocitos B
purificados cultivados con BYbe VR4447/VR4126,
BYbe VR4447/VR4127, BYbe VR4447/VR4130, BYbe
VR4447/VR4126/VR645/Albúmina y BYbe
VR4447/VR4130/VR645/Albúmina. Datos mostrados de
30 un solo donante.

Figura muestra los niveles basales de fosforilación en

30 linfocitos B no estimulados de 12 muestras de pacientes sanos y 12 de SLE.

Figura muestra el efecto de BYbe VR4447/VR4130
31 específico para CD79b + CD22 en la fosforilación de NFkB de linfocitos B inducidos con anti-IgM,
5 de 12 voluntarios sanos (HV) y 12 donantes de SLE.

Figura muestra el efecto de BYbe VR4447/VR4130
32 específico para CD79b + CD22 en la fosforilación de Akt de linfocitos B inducidos con anti-IgM,
10 de 12 voluntarios sanos (HV) y 12 donantes de SLE.

Figura muestra el efecto de BYbe VR4447/VR4130
33 específico para CD79b + CD22 en la fosforilación de Syk de linfocitos B inducidos con anti-IgM,
15 de 12 voluntarios sanos (HV) y 12 donantes de SLE.

Figura muestra el efecto de BYbe VR4447/VR4130
34 específico para CD79b + CD22 en la fosforilación de Erk 1 y 2 de linfocitos B inducidos con anti-IgM,
20 de 12 voluntarios sanos (HV) y 12 donantes de SLE.

Figura Secuencias de la presente divulgación

35

Descripción detallada de la divulgación

La señalización del receptor de linfocitos B es una función crítica de los linfocitos B y un requisito para la activación específica de antígeno de los linfocitos B. La
30 señalización de BCR es vital desde los estadios tempranos del desarrollo de los linfocitos B hasta la activación y el

desarrollo de las respuestas de los linfocitos B de memoria. El receptor de linfocitos B está compuesto por una molécula de inmunoglobulina (Ig) superficial que se asocia con el complejo heterodimérico de CD79a y CD79b. Se cree que cuando la Ig superficial reconoce un antígeno, esto da como resultado una agrupación del complejo CD79a/b que produce una activación aguas abajo de la cascada de señalización inmediata que incluye cinasas de la familia de Src así como las tirosina cinasa Syk y Btk. Este complejo de señalización puede reclutar proteínas adaptadoras, tales como CD19 y BLNK y da como resultado la activación de PLC γ 2 y PI3K que a su vez, pueden activar vías aguas abajo adicionales, tales como aquellas que controlan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de los linfocitos B. Este complejo de señalización puede estar regulado además por otras segundas señales mediante la señalización a través de BAFF-R, IL-21R y CD40 y también puede estar regulado por otras moléculas de señalización, tales como CD19, CD21, CD83, CD22, CD32b y CD45, entre otras. Tras haber reconocido el BCR al antígeno, una de las primeras respuestas activadas es la regulación positiva de los receptores de superficie, tales como las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Estas moléculas se unen a los receptores correspondientes en los linfocitos T, que proporcionan señales de supervivencia y activación adicionales que permiten la supervivencia y la expansión de linfocitos T que reconocen antígenos en el contexto de la clase II del MHC. Esta respuesta se amplifica adicionalmente por la capacidad de los linfocitos B para presentar antígenos en el contexto de la clase II del MHC de nuevo al linfocito T, que libera factores tales como IL-

2 e IL-21. Estas citocinas a su vez expanden en gran medida el número de linfocitos B. Por lo tanto, la regulación negativa de CD86 en la superficie de las células puede ser indicativa de la inhibición de la señalización de los
5 linfocitos B.

Además, la inhibición del receptor de linfocitos B puede ocasionar la inhibición de funciones aguas abajo. Uno de estos resultados podría ser la inhibición de moléculas coestimuladoras, tales como CD86 (o la expresión reducida
10 de las mismas), lo que ocasionaría la inhibición de la función, supervivencia y diferenciación de los linfocitos T.

Por lo tanto, la inhibición de la señalización del receptor de linfocitos B podría ser beneficiosa para controlar funciones aberrantes de los linfocitos B asociadas con la autoinmunidad y con el cáncer. La
15 señalización del receptor de linfocitos B es necesaria para la proliferación, diferenciación, presentación de antígenos y liberación de citocinas de los linfocitos B en las enfermedades autoinmunitarias. Por lo tanto, la inhibición
20 de la actividad de BCR puede regular las funciones de los linfocitos B, tales como la secreción de inmunoglobulina, la activación de linfocitos T y el control de la actividad inadecuada de los linfocitos B asociada con, por ejemplo, afecciones autoinmunitarias. Además, hay ciertas leucemias
25 y linfomas de linfocitos B que necesitan de la señalización del receptor de linfocitos B para su supervivencia y crecimiento que pueden controlarse mediante inhibidores de la activación del receptor de linfocitos B.

CD22 (también conocido como agrupación de
30 diferenciación-22) es una proteína conocida. CD22 es un co-receptor inhibidor del receptor de linfocitos B (BCR) y

desempeña un papel crítico para establecer umbrales de señalización para la activación de los linfocitos B. La secuencia humana se encuentra disponible en la entrada de UniProt número P20273 (SEQ ID NO: 244 y sin péptido de
5 señal, aminoácidos 20-847 de la SEQ ID NO: 244). La versión murina es la entrada de UniProt P35329. La presente divulgación se refiere a todas las formas de CD22, de cualquier especie, en particular la humana y variantes naturales de las mismas. En una realización, CD22 se
10 refiere a la forma humana de la proteína.

En una realización, la afinidad del dominio de unión por CD22 en una molécula de la presente divulgación es de aproximadamente 100nM o más fuerte, tal como aproximadamente 50nM, 20nM, 10nM, 1nM, 500pM, 250pM, 200pM,
15 100pM o más fuerte, en particular, una afinidad de unión de 50pM o más fuerte. En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD22.

CD79, tal como se usa en el presente documento, se
20 refiere al complejo formado por CD79a y CD79b. Por consiguiente, los anticuerpos o los dominios de unión que se unen a CD79 pueden unirse a CD79a y/o CD79b. Tal como se usa en el presente documento, que se una a CD79a y/o CD79b se refiere a que es específico para CD79a, específico para
25 CD79b, específico tanto para CD79a como para CD79b (es decir, reconoce un epítipo en CD79a y el mismo anticuerpo o dominio de unión también reconoce un epítipo en CD79b, es decir, es panespecífico) o es específico para el complejo de CD79a y CD79b (es decir, reconoce un epítipo formado por
30 la interacción de CD79a y CD79b en la forma de complejo y

es capaz de distinguir la forma de complejo de los componentes individuales).

En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD79a.

En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD79b.

En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para el complejo de CD79, es decir, reconoce un epítipo presente en el complejo y es específico para el mismo, por ejemplo, un epítipo que comprende una interacción entre CD79a y CD79b.

En una realización, incluso en los casos donde el dominio de unión es específico para CD79a o CD79b, se apreciará que el dominio de unión seguirá uniéndose a CD79a o CD79b cuando se encuentren en forma de complejo, ya que las dos proteínas se expresan conjuntamente en la superficie celular de manera natural.

En una realización, se proporciona una construcción que comprende un dominio de unión de la divulgación específica.

Tal como se emplea en el presente documento, una construcción que comprende un dominio de unión incluye cualquier estructura capaz de proporcionar el dominio de unión, de tal forma que puede unirse al antígeno para el cual es específica. Los ejemplos de construcción incluyen,, pero sin limitación, un receptor de antígeno quimérico, un receptor de linfocitos T modificado, una molécula de anticuerpo, un aptámero y similares.

Se apreciará que las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden incorporarse en otros formatos moleculares o construcciones, en donde los dominios de unión proporcionados por la presente invención se unen a CD22, que por tanto actúa como diana. Por ejemplo, pueden usarse regiones de unión de la presente invención, por ejemplo, fragmentos, tales como fragmentos Fab o scFv, para redirigir a células *in vivo*, por ejemplo, mediante la transducción de linfocitos T con receptores quiméricos (células CAR-T) y después transferir estas células al paciente (Nat. Revs. Drug Disc. 2015. 14. 499-509). Por consiguiente, la presente invención también proporciona un receptor de antígeno quimérico que comprende uno o más dominios de unión como se han descrito en el presente documento.

En los casos donde hay dos regiones variables en un dominio de unión y/o en cada dominio de unión, las dos regiones variables funcionarán de manera cooperativa para proporcionar especificidad por el antígeno relevante, por ejemplo, son un par afín o madurado por afinidad, para proporcionar una afinidad adecuada de tal forma que el dominio es específico para un antígeno particular. Típicamente, son un par de región variable de cadena pesada y ligera (par de VH/VL).

Tal como se emplea en el presente documento, "molécula multiespecífica" se refiere a una molécula con la capacidad de unirse específicamente a al menos dos antígenos distintos, por ejemplo, diferentes antígenos. En una realización, la molécula multiespecífica es una molécula biespecífica, triespecífica o tetraespecífica, en particular, una molécula biespecífica o triespecífica.

En una realización, la molécula de la presente divulgación es biespecífica.

En una realización, la molécula de la presente divulgación es triespecífica.

5 En una realización, la molécula de anticuerpo multiespecífica (tal como una molécula de anticuerpo biespecífica) de la divulgación comprende, además de un dominio de unión específico para CD22, un dominio específico para otro antígeno.

10 En una realización, la molécula de la presente divulgación es monoespecífica para CD79 y monoespecífica para CD22, es decir, la molécula comprende únicamente un dominio de unión que se une a CD79 y un dominio de unión que se une a CD22.

15 En una realización, la molécula multiespecífica de la presente divulgación es una sola cadena.

En una realización, la molécula multiespecífica de la presente divulgación comprende una cadena pesada y también una cadena ligera. En un ejemplo, tal como se emplea en el
20 presente documento, un emparejamiento de cadena pesada y ligera no se cita como un dímero, en particular en el caso de una realización donde la molécula de la presente divulgación no comprende multímeros, tales como dímeros, unidad/fragmento o componentes del anticuerpo.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación se extiende a una molécula de un formato adecuado específica para al menos CD22 y CD79a y al uso de anticuerpos/fragmentos o de combinaciones de los mismos específicas para CD22 y CD79a en una molécula
30 multiespecífica, tal como un formato biespecífico o un formato triespecífico.

En un aspecto, la divulgación se extiende a una molécula de un formato adecuado específica para al menos CD22 y CD79b y al uso de anticuerpos/fragmentos o de combinaciones de los mismos específicas para CD22 y CD79b en una molécula multiespecífica, tal como un formato biespecífico o un formato triespecífico.

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación se extiende a una molécula de un formato adecuado específica para al menos CD22 y el complejo CD79a/b y al uso de anticuerpos/fragmentos o de combinaciones de los mismos específicas para CD22 y el complejo CD79a/b en una molécula multiespecífica, tal como un formato biespecífico o un formato triespecífico.

En una realización, la molécula de la presente divulgación es triespecífica, por ejemplo, en los casos donde el tercer dominio de unión es capaz de prolongar la semivida de la molécula, por ejemplo, mediante la unión a una proteína sérica transportadora.

En el plasma, existe una diversidad de proteínas e incluyen la proteína de unión a tiroxina, transtiretina, glucoproteína $\alpha 1$ ácida, transferrina, fibrinógeno y albúmina o un fragmento de cualquiera de las mismas (Bartalena y Robbins, 1993, Clinics in Lab. Med. 13:583-598; Bree et al., 1986, Clin. Pharmacokin. 11:336-342; Gitlin et al. 1964, J. Clin. Invest. 10:1938-1951; Peters, 1985, Adv Protein Chem. 37:161-245; Waldeman y Strober, 1969, Progr. Allergy, 13:1-110. En un ejemplo, el tercer dominio de unión es específico para albúmina sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana.

FORMATOS DE MOLÉCULA MULTIESPECÍFICOS

Se conocen en la técnica ejemplos de moléculas multiespecíficas para su uso en la presente invención, por ejemplo, tal como se divulgan en el artículo de revisión "The coming of Age of Engineered Multivalent Antibodies, Nunez-Prado *et al* Drug Discovery Today Vol 20 Número 5, 5 marzo de 2015, páginas 588-594, D. Holmes, Nature Rev Drug Disc Nov 2011:10; 798, Chan y Carter, Nature Reviews Immunology vol 10, mayo de 2010, 301, incorporados al presente documento por referencia.

10 En una realización, los formatos multiespecíficos incluyen aquellos conocidos en la técnica y aquellos descritos en el presente documento, tales como en donde el formato de molécula se selecciona entre el grupo que comprende o que consiste en:

- 15 • sdAb en tándem, sdAb-sdAb en tándem (tres sdAb);
- (scFv)₂ (también citado como scFv en tándem), scFv-dsFv, dsscFv-dsFv (dsFv)₂;
- diabody, dsdiabody, didsdiabody,
- 20 • scdiabody , dsscdiabody, didsscdiabody;
- anticuerpo Dart, es decir, VL₁ enlazador VH₂ enlazador y VH₁ enlazador VL₂, en donde el extremo C-terminal de VH₁ y VH₂ están unidos por un enlace disulfuro;
- BiTE®, dsBiTE, didsBiTE;
- 25 • Di-diabody (véase Nunez-Prado *et al*, en particular la molécula 25 en la Fig 1 del mismo), dsdi-diabody, didsdi-diabody;
- triabody, dstriabody, didstriabody, tridstriabody;
- tetrabodies, dstetrabody, didstetrabody,
- 30 tridstetrabody, tetradstetrabody;

- tandab (véase Nunez-Prado *et al*, en particular la molécula 22 en la Fig 1 del mismo); dstandab, didstandab, tridstandab, tetradstandab;

5

- $[sc(Fv)_2]_2$, (véase Nunez-Prado *et al*, en particular la molécula número 22 en la Fig 1 del mismo),
ds $[sc(Fv)_2]_2$, dids $[sc(Fv)_2]_2$, trids $[sc(Fv)_2]_2$,
tetrads $[sc(Fv)_2]_2$;

- Pentabody (véase Nunez-Prado *et al*, en particular la molécula 27 en la Fig 1 del mismo);

10

- Fab-scFv (también citado como bibody), Fab'scFv, FabdsscFv (o BYbe), Fab'dsscFv;

- tribody, dtribody, didtribody (también citado como FabdidsscFv o TrYbe o Fab-(dsscFv)₂), Fab'didsscFv;

15

- Fabdab, FabFv, Fab'dab, Fab'Fv;

- Fab enlazador sencillo Fv (también citado en el presente documento como FabdsFv, tal como se divulga en el documento WO2014/096390), Fab' enlazador sencillo Fv (también citado en el presente documento como Fab'dsFv);

20

- FabscFv enlazador sencillo Fv, Fab'scFv enlazador sencillo Fv;

- FabdsscFv enlazador sencillo Fv, Fab'dsscFv enlazador sencillo Fv;

25

- FvFabFv, FvFab'Fv, dsFvFabFv, dsFvFab'Fv, FvFabdsFv, FvFab'dsFv, dsFvFabdsFv, dsFvFab'dsFv,

- FabFvFv, Fab'FvFv, FabdsFvFv, Fab'dsFvFv, FabFvdsFv, Fab'FvdsFv, FabdsFvdsFv, Fab'dsFvdsFv,

30

- diFab, diFab' que incluye un diFab' conjugado químicamente,

- $(FabscFv)_2$, $(Fab)_2scFvdsFv$, $(Fab)_2dsscFvdsFv$, $(FabdsFv)_2$,

- $(\text{Fab}'\text{scFv})_2$, $(\text{Fab}')_2\text{scFvdsFv}$, $(\text{Fab}')_2\text{dsscFvdsFv}$,
 $(\text{Fab}'\text{dscFv})_2$,
- $V_{\text{H}}\text{HC}_{\text{K}}$ (véase Nunez-Prado *et al*, en particular la
molécula número 6 en la Fig 1 del mismo);
- minibody, dsminibody, didsminibody,
- un miniantibody (ZIP) [véase Nunez-Prado *et al* en
particular la molécula número 7 en la Fig 1 del mismo],
dsminiantibody (ZIP) y didsminiantibody (ZIP);
- tribi-minibody [véase Nunez-Prado *et al*, en
particular la molécula número 15 en la Fig 1 del mismo],
dtribi-minibody, didtribi-minibody, tridtribi-minibody;
- diabody-CH₃, dsdiabody-CH₃, didsdiabody-CH₃,
scdiabody-CH₃, dsscdiabody-CH₃, didsscdiabody-CH₃,
- scFv-CH₃ en tándem, dsscFv-CH₃ en tándem,
didsscFv-CH₃ en tándem, tridsscFv-CH₃ en tándem,
tetradsscFv-CH₃ en tándem,
- scFv-Fc (también citado en el presente documento
como un $(\text{scFvCH}_2\text{CH}_3)_2$), tal como se describe en el documento
WO2008/012543 y una versión monocatenaria de mismo,
dsscFvscFv-Fc, dsscFv-Fc (también citado en el presente
documento como $(\text{dsscFvCH}_2\text{CH}_3)_2$), scFv-dsFv-Fc, dsscFv-dsFv-
Fc, dsFv-Fc (también citado en el presente documento como
 $(\text{dsFvCH}_2\text{CH}_3)_2$),
- molécula scorpion (Trubion), es decir, un dominio
de unión, enlazador -CH₂CH₃ dominio de unión, tal como se
describe en el documento US8,409,577;
- SMIP (Trubion) es decir, $(\text{scFv-CH}_2\text{CH}_3)_2$;
- $(\text{dsFvCH}_2\text{CH}_3)_2$, scFv-Fc en tándem, dsscFvscFv-Fc en
tándem, dsscFv-Fc en tándem,
- scFv-Fc-scFv, dsscFv-Fc-scFv, scFv-Fc-dsscFv,

• diabody-Fc, dsdiabody-Fc, didsdiabody-Fc, triabody-Fc, dstriabody-Fc, didstriabody-Fc, tridstriabody-Fc, tetrabody-Fc, dstetrabody-Fc, didstetrabody-Fc, tridstetrabody-Fc, tetradstetrabody-Fc, dstetrabody-Fc, didstetrabody-Fc, tridstetrabody-Fc, tetradstetrabody-Fc, scdiabody-Fc, dsscdiabody, didsscdiabody;

• anticuerpo bi o trifuncional, por ejemplo, con diferentes regiones variables de cadena pesada y cadenas ligeras comunes, por ejemplo, el formato de anticuerpo biespecífico Merus (Biclonics®) con cadenas ligeras comunes de una secuencia fija y diferentes cadenas pesadas (que incluyen diferentes CDR) y un dominio CH₃ modificado por ingeniería genética para dirigir la dimerización de las diferentes cadenas pesadas,

• Duobody (es decir, en donde una cadena de longitud completa en el anticuerpo tiene una especificidad diferente respecto de la otra cadena de longitud completa en el anticuerpo);

• un anticuerpo de longitud completa en donde se ha empleado intercambio del brazo de Fab para crear un formato biespecífico;

• anticuerpo bi o trifuncional, en donde un anticuerpo de longitud completa tiene una cadena pesada común y diferentes cadenas ligeras, también citado como kappa/lambda cuerpo' o 'κ/λ-cuerpo, véase el documento WO2012/023053;

• Ig-scFv uno, dos, tres o cuatro desde el extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera, scFv-Ig uno, dos, tres o cuatro desde el extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera, enlazador individual Ig-Fv, Ig-dsscFv uno, dos, tres o cuatro desde el extremo C-terminal de la cadena

pesada o ligera (con uno, dos, tres o cuatro enlaces disulfuro);

• Ig-dsscFv uno, dos, tres o cuatro desde el extremo N-terminal de la cadena pesada o ligera (con uno, dos, tres o cuatro enlaces disulfuro),

• Ig enlazador individual Fv (véase el documento PCT/EP2015/064450),

• Ig-dab, dab-Ig, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V,

• scFabFvFc, scFabdsFvFc (versión con enlazador individual scFavFv), (FabFvFc)₂, (FabdsFvFc)₂, scFab'FvFc, scFab'dsFvFc, (Fab'FvFc)₂, (Fab'dsFvFc)₂ y

• DVDIg, que se describen en más detalle más adelante.

En una realización, los formatos de molécula multiespecífica incluyen los conocidos en la técnica y aquellos descritos en el presente documento, tal como en donde el formato de molécula se selecciona entre el grupo que comprende o que consiste en: diabody, scdiabody, triabody, tribody, tetrabodies, scFv en tándem, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-scFv, Fab-dsscFv, Fab-(dsscFv)₂, diFab, diFab', scFv-Fc en tándem, scFv-Fc-scFv, scdiabody-Fc, scdiabody-CH₃, Ig-scFv, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V, Duobody y DVDIg, que se describen en más detalle más adelante.

En una realización, la molécula de anticuerpo multiespecífica de la presente divulgación no comprende un dominio Fc, es decir, no comprende un dominio CH₂ y un dominio CH₃, por ejemplo, la molécula se selecciona entre el grupo que comprende un scFv en tándem, scFv-dsFv, dsscFv-dsFv didsFv, diabody, dsdiabody, didsdiabody, scdiabody (también citado como un (scFv)₂), dsscdiabody, triabody, dstriabody, didstriabody, tridstriabody, ,

tetrabodies, dstetrabody, didstetrabody, tridstetrabody, tetradstetrabody, tribody, dstribody, didstribody, Fabdab, FabFv, Fab'dab, Fab'Fv, Fab enlazador sencillo Fv (tal como se divulga en el documento WO2014/096390), Fab' enlazador individual Fv, FabdsFv, Fab'dsFv, Fab-scFv (también citad
5 como un bibody), Fab'scFv, FabdsscFv, Fab'dsscFv, FabdidsscFv, Fab'didsscFv, FabscFv enlazador individual Fv, Fab'scFv enlazador individual Fv, FabdsscFvs enlazador individual Fv, Fab'dsscFv enlazador individual Fv, FvFabFv, FvFab'Fv, dsFvFabFv, dsFvFab'Fv, FvFabdsFv, FvFab'dsFv, dsFvFabdsFv, dsFvFab'dsFv, FabFvFv, Fab'FvFv, FabdsFvFv, Fab'dsFvFv, FabFvdsFv, Fab'FvdsFv, FabdsFvdsFv, Fab'dsFvdsFv, diFab, diFab', incluyendo un diFab' químicamente conjugado, (FabscFv)₂, (Fab)₂scFvdsFv, (Fab)₂dsscFvdsFv, (FabdscFv)₂, minibody, dsminibody, didsminibody, diabody-CH₃, dsdiabody-CH₃, didsdiabody-CH₃, scdiabody-CH₃, dsscdiabody-CH₃, didsscdiabody-CH₃, scFv-CH₃ en tándem, dsscFv-CH₃ en tándem, didsscFv-CH₃ en tándem, tridsscFv-CH₃ en tándem y tetradsscFv-CH₃ en tándem.

20 En una realización, la molécula de la presente divulgación no comprende un dominio Fc.

En una realización, la molécula de la presente divulgación comprende un dominio Fc alterado, tal como se describe más adelante en el presente documento.

25 Tal como se emplea en el presente documento, dominio Fc se refiere generalmente a $-(CH_2CH_3)_2$, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

En una realización, la molécula de la presente divulgación no comprende un fragmento $-CH_2CH_3$.

30 En una realización, la molécula de la presente divulgación no comprende un dominio CH₂.

En una realización, la molécula de la presente divulgación no comprende un dominio CH₃.

5 Molécula, tal como se emplea en el presente documento, se usa en el sentido bioquímico para hacer referencia a un grupo de átomos que forman una masa orgánica, en particular, proteica, que incluye un complejo adecuado para su manipulación como entidad única en condiciones adecuadas una vez que se haya formado el complejo, por ejemplo, un complejo formado por dos o más cadenas de polipéptido.

10 Molécula y construcción se usan de manera indistinta en el presente documento, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. No obstante, construcción puede emplearse con mayor frecuencia para referirse a una molécula de polinucleótido y molécula puede emplearse con mayor frecuencia para referirse a una entidad que comprende principalmente aminoácidos.

20 Especificidad (o específico), tal como se emplea en el presente documento, se refiere a los casos donde los compañeros en la interacción solo se reconocen entre sí o tienen una afinidad por el otro significativamente mayor en comparación con los no compañeros, por ejemplo, una afinidad al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que, por ejemplo, un nivel de unión de fondo o la unión a otra proteína no relacionada.

25 Un "dominio de unión", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una región de unión, típicamente un polipéptido, capaz de unirse a un antígeno diana, por ejemplo, con una afinidad suficiente para caracterizar el dominio como específico por el antígeno. En 30 una realización, el dominio de unión contiene al menos un dominio variable o un derivado del mismo, por ejemplo, un

par de dominios variables o derivados de los mismos, tales como un par afín de dominios variables o un derivado de los mismos. Típicamente, esto es un par de VH/VL.

5 Puede usarse cualquier dominio de unión adecuado en las moléculas multiespecíficas de la presente invención. Estas pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada.

En una realización, se emplea una estructura de armazón biocompatible en un dominio de unión de las moléculas de la presente divulgación y dichas estructuras
10 están basadas en armazones o esqueletos de proteínas distintos de los dominios de inmunoglobulina. Por ejemplo, pueden usarse aquellos basados en fibronectina, anquirina, lipocalina, neocarzinostatina, citocromo b, dedo de cinc CP1, PST1, hélice superenrollada, LACI-D1, dominio Z y
15 dominios de tendramisat (véase, por ejemplo, Nygren y Uhlen, 1997, Current Opinion in Structural Biology, 7, 463-469).

La expresión "moléculas multiespecíficas", tal como se usa en el presente documento, también puede incluir agentes de unión a base de armazones biológicos, incluyendo
20 adnectinas, affibodies, darpins, filómeros, avímeros, aptámeros, anticalinas, tetranectinas, microbodies, afilinas y dominios Kunitz.

La molécula multiespecífica de la presente invención es típicamente una molécula de anticuerpo multiespecífica,
25 es decir, al menos uno o más de los dominios de unión de la molécula multiespecífica proceden de un anticuerpo o un fragmento del mismo.

En los casos donde el dominio de unión procede de un anticuerpo, un "dominio o sitio de unión", tal como se
30 emplea en el presente documento, es la parte del anticuerpo que entra en contacto con el antígeno. En una realización,

el dominio de unión contiene al menos un dominio variable o un derivado del mismo, por ejemplo, un par de dominios variables o derivados de los mismos, tales como un par afín de dominios variables o un derivado de los mismos.
5 Típicamente, esto es un par de VH/VL.

Las regiones variables (también citadas en el presente documento como dominios variables) comprenden generalmente 3 CDR y un armazón adecuado. En una realización, el dominio de unión comprende dos regiones variables, una región
10 variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada y estos elementos en conjunto contribuyen a la especificidad de la interacción de unión del anticuerpo o el fragmento de unión.

En una realización, los dominios variables en un
15 dominio de unión en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación son un par afín.

Un "par afín", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un par de dominios variables de cadena pesada y ligera (o un derivado de los mismos, tal
20 como una versión humanizada de los mismos) aislado de un hospedador en forma de una pareja preformada. Esta definición no incluye dominios variables aislados de una biblioteca, en donde no se conserva el emparejamiento original del hospedador. Los pares afines pueden ser
25 ventajosos ya que normalmente se maduran por afinidad en el hospedador y por lo tanto, pueden tener una mayor afinidad por el antígeno para el cual son específicos que una combinación de pares de dominio variable seleccionada de una biblioteca, tal como una fagoteca.

En una realización, un dominio de unión en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación es un derivado de un dominio de unión de origen natural.

Un "derivado de un dominio de origen natural", tal como se emplea en el presente documento, pretende hacer referencia a casos donde se han reemplazado o eliminado uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en la secuencia de origen natural, por ejemplo, para optimizar las propiedades del dominio, tal como eliminando cualquier propiedad no deseable pero en donde se conservan los rasgos característicos del dominio. Los ejemplos de modificaciones son la eliminación de sitios de glucosilación, anclajes de GPI o lisinas expuestas al disolvente. Estas modificaciones pueden lograrse reemplazando los restos de aminoácidos relevantes con una sustitución conservativa de aminoácidos.

La modificación en las CDR puede incluir, por ejemplo, el reemplazo de una o más cisteínas con, por ejemplo, un resto de serina. Asn puede ser el sustrato par la desaminación y puede reducirse esta propensión reemplazando el Asn y/o un aminoácido próximo por un aminoácido alternativo, tal como una sustitución conservativa. El aminoácido Asp en las CDR puede someterse a isomerización. Esta última puede minimizarse reemplazando Asp o un aminoácido próximo por un aminoácido alternativo, por ejemplo, una sustitución conservativa.

Las versiones humanizadas de una región variable también son un derivado de la misma en el contexto de la presente memoria descriptiva. La humanización puede incluir el reemplazo de un armazón no humano por un armazón humano y opcionalmente, la retromutación de uno o más restos a "restos donantes". Restos donantes, tal como se emplea en

el presente documento, se refiere a restos hallados en la región variable original aislada del hospedador, en particular, reemplazando un aminoácido dado en el armazón humano por el aminoácido en la ubicación correspondiente en el armazón donante.

En una realización, el dominio de unión o cada dominio de unión forma parte de (está incluido o incorporado en) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En una realización, los dominios de unión en las moléculas de la presente divulgación se encuentran en moléculas de inmunoglobulina/anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, "molécula de anticuerpo" incluye anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos.

En una realización, el término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un antígeno diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, péptido, etc. a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígenos (también citado como sitio de unión o dominio de unión en el presente documento), ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina.

Los "fragmentos de anticuerpo", tal como se emplean en el presente documento, se refieren a fragmentos de unión de anticuerpos que incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab modificados, Fab', Fab' modificados, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de un solo dominio, scFv, Fv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diabodies, triabodies, tetrabodies y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson,

2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217).

Un "fragmento de unión", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento capaz de
5 unirse a un péptido o antígeno diana con una afinidad suficiente para caracterizar el fragmento como específico para el péptido o antígeno.

Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo se conocen bien en la técnica (véase, por
10 ejemplo, Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para su uso en la presente divulgación incluyen los fragmentos Fab y Fab', descritos en los documentos WO05/003169, WO05/003170 y WO05/003171. Los anticuerpos multivalentes
15 pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

Las construcciones que comprenden un anticuerpo o
20 fragmento de anticuerpo incluyen receptores de antígeno quimérico (que son anticuerpos/fragmentos anclados a membrana conectados a un dominio de señalización) y receptores de linfocitos T modificados (también proteínas ancladas a membrana).

25 La expresión "fragmento Fab", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio V_L (ligero variable) y un dominio constante de una cadena ligera (C_L) y un dominio V_H (pesado variable) y
30 un primer dominio constante (CH₁) de una cadena pesada.

El Fv se refiere a dos dominios variables, por ejemplo, dominios variables cooperativos, tal como un par afín o dominios variables madurados por afinidad, es decir, un par de V_H y V_L .

5 Los dominios variables cooperativos, tal como se emplean en el presente documento, son dominios variables que se complementan entre sí y/o contribuyen ambos a la unión al antígeno para hacer que el Fv (par de V_H/V_L) sea específico para el antígeno en cuestión.

10 A continuación se presenta una lista de formatos de anticuerpo ilustrativos que pueden emplearse en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación.

"Anticuerpo de un solo dominio" (también citado en el presente documento como un da y sdAb), tal como se usa en
15 el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que consta de un solo dominio variable monomérico de anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos de un solo dominio incluyen V_H o V_L o V_HH .

sdAb en tándem tal como se usa en el presente
20 documento, se refiere a dos dominios de anticuerpo conectados por un enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico, en particular donde los dominios de anticuerpo tienen especificidad por diferentes antígenos.

sdAb-sdAb en tándem tal como se emplea en el presente
25 documento, se refiere a tres dominios de anticuerpo conectados en serie por dos enlazadores, por ejemplo, enlazadores peptídicos, en particular donde los dominios de anticuerpo tienen especificidad por diferentes antígenos.

dsFv tal como se emplea en el presente documento,
30 se refiere a un Fv con un enlace disulfuro intra-variable. El dsFv puede ser un componente de una molécula de mayor

tamaño, por ejemplo, aquella a la que pueden unirse los dominios variables, por ejemplo, a través de un enlazador de aminoácidos a otro fragmento/componente de anticuerpo.

(dsFv)₂ tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un dsFv con un dominio unido, por ejemplo, a través de un enlazador peptídico o un enlace disulfuro (por ejemplo, entre el extremo C-terminal de dos V_H) a un dominio en un segundo dsFv, asemejándose el formato a un (scFv)₂ descrito más adelante, pero comprendiendo cada par de regiones variables un enlace disulfuro entre las regiones variables.

Componente tal como se emplea en el presente documento se refiere a un bloque de construcción o a una porción de una molécula multiespecífica de la presente divulgación, en particular, en los casos donde el componente es un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv, Fab u otro fragmento, en particular, tal como se describe en el presente documento.

Fv monocatenario o abreviado como "scFv", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende dominios de anticuerpo V_H y V_L unidos (por ejemplo mediante un enlazador peptídico) formando una sola cadena de polipéptido. Las regiones constantes de la cadena pesada y ligera se omiten en este formato.

dsscFv tal como se emplea en el presente documento se refiere a un scFv con un enlace disulfuro dentro de la región variable.

scFv en tándem (también citado en el presente documento como discFv o (scFv)₂), tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos scFv unidos a través

de un enlazador individual, de tal forma que hay un solo enlazador entre los Fv, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 9b.

5 dsscFv en tándem (también citado en el presente documento como scFvdsscFv o dsscFvscFv), tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos scFv unidos a través de un solo enlazador de tal forma que hay un solo enlazador entre los Fv, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 9b y en donde uno de los scFv tiene un enlace
10 disulfuro dentro de la región variable.

didsscFv en tándem (también citado en el presente documento como didsscFv), tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos scFv unidos a través de un solo enlazador de tal forma que hay un solo enlazador entre los
15 Fv, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 9b y en donde cada uno de los scFv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

scFv-dsFv tal como se emplea en el presente documento, es un scFv unido, por ejemplo, mediante un
20 enlazador peptídico, a un dominio Fv que está formado por dos dominios variables unidos a través de un enlace disulfuro para formar un dsFv. En este formato, la VH o VL del scFv pueden unirse a la VH o VL del dsFv.

dsscFv-dsFv tal como se emplea en el presente
25 documento, es un dsscFv unido, por ejemplo, mediante un enlazador peptídico, a un dominio Fv que está formado por dos dominios variables unidos a través de un enlace disulfuro para formar un dsFv. En este formato, la VH o VL del dsscFv pueden unirse a la VH o VL del dsFv.

30 Diabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos pares de Fv V_H/V_L que tienen dos

enlazadores entre los Fv, de tal forma que la V_H de un primer Fv está unida a la V_L del segundo Fv y la V_L del primer Fv está unida a la V_H del segundo Fv.

5 dsDiabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un diabody que comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

didsDiabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un diabody que comprende dos enlaces disulfuro entre la región variable, es decir, un ds
10 entre cada par de regiones variables.

Sc-diabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un diabody que comprende un enlazador entre las Fv, de tal forma que la molécula comprende tres enlazadores y forma dos scFv normales, por
15 ejemplo, VH₁ enlazador VL₁ enlazador VH₂ enlazador VL₂.

dssc-diabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un sc-diabody con un enlace disulfuro dentro de la región variable.

didssc-diabody, tal como se emplea en el presente
20 documento, se refiere a un sc-diabody con un enlace disulfuro dentro de la región variable entre cada par de regiones variables.

Dart tal como se emplea en el presente documento se refiere a VL₁ enlazador VH₂ enlazador y a VH₁ enlazador VL₂,
25 en donde el extremo C-terminal de las VH₁ y VH₂ están unidos por un enlace disulfuro Paul A. Moore *et al Blood*, 2011; 117(17):4542-4551.

Bite® tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende dos pares de
30 dominios variables en el siguiente formato: un dominio del par 1 (por ejemplo, VH₁) conectado a través de un enlazador

a un dominio del par 2 (por ejemplo, VH_2 o VL_2), estando dicho segundo dominio conectado mediante un enlazador al dominio adicional del par 1 (por ejemplo, VL_1) conectado a su vez al dominio restante del par dos (es decir, VL_2 o VH_2).

Di-diabody véase Nunez-Prado *et al.*, en particular, la molécula número 25 en la Fig 1 del mismo.

Dsdi-diabody tal como se emplea en el presente documento, es un di-diabody con un enlace disulfuro dentro de la región variable.

Didsdi-diabody, tal como se emplea en el presente documento, es un di-diabody con un enlace disulfuro dentro de la región variable entre cada par de regiones variables.

Triabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un formato similar al del diabody que comprende tres Fv y tres enlazadores entre los Fv.

dstriabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un triabody que comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable entre uno de los pares de dominio variable.

Didstriabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un triabody que comprende dos enlaces disulfuro dentro de la región variable, es decir, un ds entre cada uno de los dos pares de dominio variable.

Tridstriabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un triabody que comprende tres enlaces disulfuro dentro de la región variable, es decir, un ds entre cada par de regiones variables.

Tetrabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un formato similar al diabody que comprende cuatro Fv y cuatro enlazadores entre Fv.

dstetrabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un tetrabody que comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable entre uno de los pares de dominio variable.

5 Didstetrabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un tetrabody que comprende dos enlaces disulfuro dentro de la región variable, es decir, un ds entre cada uno de los dos pares de dominio variable.

10 Tridstetrabody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un tetrabody que comprende tres enlaces disulfuro dentro de la región variable, es decir, un ds entre cada uno de los tres pares de regiones variables.

15 Tetradstetrabody, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un tetrabody que comprende cuatro enlaces disulfuro dentro de la región variable, es decir, un ds entre cada dominio variable.

20 Tribody (también citado como un Fab(scFv)₂), tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con un primer scFv unido al extremo C-terminal de la cadena ligera y un segundo scFv unido al extremo C-terminal de la cadena pesada.

25 dstribody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un tribody que comprende un dsscFv en una de las dos posiciones.

didstribody o TrYbe, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un tribody que comprende dos dsscFvs.

30 dsFab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab con un enlace disulfuro dentro de la región variable.

dsFab' tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' con un enlace disulfuro dentro de la región variable.

scFab es un fragmento Fab monocatenario.

5 scFab' es un fragmento Fab' monocatenario.

dsscFab es un dsFab en forma monocatenaria.

dsscFab' es un dsFab' en forma monocatenaria.

Fabdab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con dominio de anticuerpo
10 unido a la cadena pesada o ligera del mismo, opcionalmente a través de un enlazador.

Fab'dab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab' con dominio de anticuerpo
15 unido a la cadena pesada o ligera del mismo, opcionalmente a través de un enlazador.

FabFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con una región variable adicional unida al extremo C-terminal de cada uno de los
20 siguientes, el CH1 de la cadena pesada y el CL de la cadena ligera; véase, por ejemplo, el documento WO2009/040562. El formato puede proporcionarse en forma de una versión PEGilada del mismo; véase, por ejemplo, el documento WO2011/061492,

Fab'Fv tal como se emplea en el presente documento, es similar a FabFv, en donde la porción Fab se reemplaza
25 por un Fab'. El formato puede proporcionarse en forma de una versión PEGilada del mismo.

FabdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un FabFv en donde un enlace disulfuro entre
30 los Fv estabiliza las regiones variables unidas en el extremo C-terminal, véase, por ejemplo, el documento

WO2010/035012. El formato puede proporcionarse en forma de una versión PEGilada del mismo.

Fab enlazador individual Fv y Fab' enlazador individual, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab o Fab' unido a un dominio variable, por ejemplo, mediante un enlazador peptídico y dicho dominio variable está unido a un segundo dominio variable a través de un enlace disulfuro dentro del dominio variable, formando de este modo un dsFv, véase, por ejemplo, el documento WO2014/096390.

Fab-scFv (también citado como un bibody), tal como se emplea en el presente documento, es una molécula Fab con un scFv unido al extremo C-terminal de la cadena ligera o pesada, opcionalmente a través de un enlazador.

Fab'-scFv tal como se emplea en el presente documento, es una molécula Fab' con un scFv unido al extremo C-terminal de la cadena ligera o pesada, opcionalmente a través de un enlazador.

FabdsscFv o BYbe tal como se emplea en el presente documento, es un Fab-scFv con un enlace disulfuro entre las regiones variables del Fv monocatenario.

Fab'dsscFv tal como se emplea en el presente documento, es un Fab'scFv con un enlace disulfuro entre las regiones variables del Fv monocatenario.

FabscFv-dab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab con un scFv unido al extremo C-terminal de una cadena y un dominio de anticuerpo unido al extremo C-terminal de la otra cadena.

Fab'scFv-dab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' con un scFv unido al

extremo C-terminal de una cadena y un dominio de anticuerpo unido al extremo C-terminal de la otra cadena.

5 FabdsscFv-dab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab con un dsscFv unido al extremo C-terminal de una cadena y un dominio de anticuerpo unido al extremo C-terminal de la otra cadena.

10 Fab'dsscFv-dab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' con un dsscFv unido al extremo C-terminal de una cadena y un dominio de anticuerpo unido al extremo C-terminal de la otra cadena.

15 FabscFv enlazador individual Fv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab enlazador individual Fv, en donde un dominio del Fv está unido a la cadena pesada o ligera del Fab y un scFv está unido a la otra cadena de Fab y los dominios del Fv están conectados mediante un disulfuro dentro de la región variable.

20 FabdsscFv enlazador individual Fv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un FabscFv enlazador individual Fv, en donde el scFv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

25 Fab'scFv enlazador individual Fv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' enlazador individual Fv, en donde un dominio del Fv está unido a la cadena pesada o ligera del Fab y un scFv está unido a la otra cadena de Fab y los dominios del Fv están conectados mediante un disulfuro dentro de la región variable.

30 Fab'dsscFv enlazador individual Fv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab'scFv enlazador individual Fv, en donde el scFv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

FvFabFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera.

FvFab'Fv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab' y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera.

dsFvFabFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab, en donde el primer Fv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera.

FvFabdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera y en donde el segundo Fv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

dsFvFab'Fv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab', en donde el primer Fv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera.

FvFab'dsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab' y en donde el segundo Fv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

dsFvFabdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab, en donde el primer Fv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera y en donde el segundo Fv también comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

dsFvFab'dsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un Fab' con los dominios de un primer Fv unidos al extremo N-terminal de la cadena pesada y ligera del Fab', en donde el primer Fv comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable y los dominios de un segundo Fv unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera y en donde el segundo Fv también comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

FabFvFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con dos pares de Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera; véase, por ejemplo, el documento WO2011/086091.

Fab'FvFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab' con dos pares de Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera; véase, por ejemplo, el documento WO2011/086091.

FabdsFvFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con dos pares de Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera; véase, por ejemplo, el documento
5 WO2011/086091, en donde el primer par de Fv unido directamente al extremo C-terminal comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

Fab'dsFvFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab' con dos pares de
10 Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera; véase, por ejemplo, el documento WO2011/086091, en donde el primer par de Fv unido directamente al extremo C-terminal comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

FabFvdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con dos pares de Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera, en donde el segundo par de Fv en el
15 extremo C-terminal de la molécula comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.
20

Fab'FvdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab' con dos pares de Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera, en donde el segundo par de Fv en el
25 extremo C-terminal de la molécula comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

FabdsFvdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con dos pares de Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena
30 pesada y ligera, en donde el primer y el segundo par de Fv comprenden un enlace disulfuro dentro de la región variable.

Fab'dsFvdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab' con dos pares de Fv unidos en serie al extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera, en donde el primer y el segundo par de Fv comprenden un enlace disulfuro dentro de la región variable.

DiFab tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos moléculas de Fab unidas a través de su extremo C-terminal de las cadenas pesadas.

DiFab' tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos moléculas Fab' unidas a través de uno o más enlaces disulfuro en la región bisagra de las mismas.

Las moléculas DiFab y DiFab' incluyen formas conjugadas químicamente de las mismas.

(FabscFv)₂ tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula diFab con dos scFv unidas a la misma, por ejemplo, unidas al extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera, tal como la cadena pesada.

(Fab'scFv)₂ tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula diFab' con dos scFv unidas a la misma, por ejemplo, unidas al extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera, tal como la cadena pesada.

(Fab)₂scFvdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un diFab al que se han unido un scFv y un dsFv, por ejemplo, uno a cada extremo C-terminal de cadena pesada.

(Fab')₂scFvdsFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un diFab' al que se han unido un scFv y un dsFv, por ejemplo, uno a cada extremo C-terminal de cadena pesada.

(Fab)₂dsscFvdsFv, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un diFab al que se han unido un dsscFv y un dsFv, por ejemplo, al extremo C-terminal de la cadena pesada.

5 (Fab')₂dsscFvdsFv, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un diFab' al que se han unido un dsscFv y un dsFv, por ejemplo, al extremo C-terminal de la cadena pesada.

10 Minibody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a (VL/VH-CH₃)₂.

dsminibody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a (VL/VH-CH₃)₂ en donde un VL/VH comprende un enlace disulfuro dentro de la región variable.

15 didsminibody tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un (dsFv-CH₃)₂

kappa/lambda cuerpo' o 'κ/λ-cuero se encuentra en el formato de una IgG normal con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, en donde las dos cadenas ligeras son diferentes entre sí, una es una cadena ligera lambda (VL - CL) y la otra es una cadena ligera kappa (VK-CK). La cadena pesada es idéntica, incluso a nivel de las CDR, tal como se describe en el documento WO2012/023053.

20 scFv-Fc tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un scFv unido al extremo C-terminal de un dominio CH₂, por ejemplo, a través de una bisagra de un fragmento de región constante -(CH₂CH₃), de tal forma que la molécula tiene 2 dominios de unión.

30 dsscFv-Fc tal como se emplea en el presente documento se refiere a un dsscFv unido al extremo N-terminal de un dominio CH₂ y un scFv unido al extremo N-terminal de un segundo dominio CH₂, por ejemplo, a través de una bisagra

de un fragmento de región constante $-(CH_2CH_3)_2$, de tal forma que la molécula tiene 2 dominios de unión.

5 didscFv-Fc tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un scFv unido al extremo C-terminal de un dominio CH₂, por ejemplo, a través de una bisagra de un fragmento de región constante $-(CH_2CH_3)_2$, de tal forma que la molécula tiene 2 dominios de unión.

10 scFv-Fc en tándem, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos scFv en tándem, en donde cada uno está unido en serie al extremo N-terminal de un dominio CH₂, por ejemplo, a través de una bisagra de un fragmento de región constante $-(CH_2CH_3)$, de tal forma que la molécula tiene 4 dominios de unión.

15 Scdiabody-Fc tal como se emplea en el presente documento es dos scdiabody, en donde cada uno está unido al extremo N-terminal de un dominio CH₂, por ejemplo, a través de una bisagra de un fragmento de región constante $-CH_2CH_3$.

20 ScFv-Fc-scFv tal como se emplea en el presente documento, se refiere a cuatro scFv, en donde cada uno de ellos está unido al extremo N-terminal y al extremo C-terminal tanto de la cadena pesada como de la ligera de un fragmento $-CH_2CH_3$.

25 Scdiabody-CH₃ tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos moléculas de scdiabody unidas cada una, por ejemplo a través de una bisagra, a un dominio CH₃.

30 IgG-scFv, tal como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un scFv en el extremo C-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras.

scFv-IgG, tal como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un scFv en el extremo N-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras.

5 V-IgG, tal como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un dominio variable en el extremo N-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras.

10 IgG-V, tal como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un dominio variable en el extremo C-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras.

DVD-Ig (también conocido como IgG de dominio V dual) es un anticuerpo de longitud completa con 4 dominios variables adicionales, uno en el extremo N-terminal de cada

15 cadena pesada y cada cadena ligera.

Duobody o "intercambio de brazo de Fab", tal como se emplea en el presente documento, es un formato de anticuerpo IgG biespecífico donde cambios de aminoácidos emparejados y diseñados por ingeniería genética en los

20 dominios constantes (típicamente CH3) de dos anticuerpos monoclonales diferentes dan lugar, tras mezclarse, a la formación de heterodímeros. Un par de cadena pesada:ligera del primer anticuerpo preferirá, como resultado de la

25 modificación por ingeniería de los restos, asociarse con un par de cadena pesada:ligera de un segundo anticuerpo. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2008/119353, WO2011/131746 y WO2013/060867.

30 En una realización, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación es un complejo de proteína biespecífica que tiene la fórmula A-X:Y-B en donde:

A-X es una primera proteína de fusión;

Y-B es una segunda proteína de fusión;

X:Y es un anclaje heterodimérico;

: es una interacción de unión entre X e Y;

5 A es un primer componente de proteína de la
bienespecífica seleccionado entre un fragmento Fab o Fab';

B es un segundo componente de proteína de la
bienespecífica seleccionado entre un fragmento Fab o Fab';

10 X es un primer compañero de unión de un par de unión
seleccionado independientemente entre un antígeno o un
anticuerpo o un fragmento de unión del mismo; y

Y es un segundo compañero de unión del par de unión
seleccionado independientemente entre un antígeno o un
anticuerpo o un fragmento de unión del mismo;

15 con la condición de que cuando X es un antígeno, Y es
un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo específico
para el antígeno representado por X y cuando Y es un
antígeno, X es un anticuerpo o un fragmento de unión del
mismo específico para el antígeno representado por Y.

20 En un aspecto, se proporciona una molécula de
anticuerpo bienespecífica que comprende o que consta de:

a) una cadena de polipéptido de fórmula (I):

VH-CH1-X- (V1) p;

b) una cadena de polipéptido de fórmula (II):

25 **VL-CL-Y- (V2) q;**

en donde:

VH representa un dominio variable de cadena pesada;

CH1 representa un dominio de una región constante de
cadena pesada, por ejemplo, el dominio 1 de la misma;

30 X representa un enlace o enlazador, por ejemplo, un
enlazador aminoacídico;

Y representa un enlace o enlazador, por ejemplo, un enlazador aminoacídico;

V1 representa un dab, scFv, dsscFv o dsFv;

VL representa un dominio variable, por ejemplo, un
5 dominio variable de cadena ligera;

CL representa un dominio de una región constante, por ejemplo, un dominio de región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V2 representa un dab, scFv, dsscFv o dsFv;

10 p es 0 o 1;

q es 0 o 1; y

cuando p es 1 q es 0 o 1 y cuando q es 1 p es 0 o 1, es decir, p y q no representan ambos 0

En una realización, la molécula de anticuerpo
15 multiespecífica comprende no más de un dominio de unión para CD22 y no más de un dominio de unión para CD79.

En una realización, q es 0 y p es 1.

En una realización, q es 1 y p es 1.

En una realización, V1 es un dab y V2 es un dab y
20 juntos forman un solo dominio de unión de un par cooperativo de regiones variables, tal como un par de VH/VL afín, que están unidas opcionalmente mediante un enlace disulfuro.

En una realización, VH y VL son específicos para CD79,
25 por ejemplo, CD79a o CD79b.

En una realización, el V1 es específico para CD79, por ejemplo, CD79a o CD79b.

En una realización, el V2 es específico para CD79, por ejemplo, CD79a o CD79b.

En una realización, el V1 y V2 juntos (por ejemplo, en forma de dominio de unión) son específicos para CD79, por ejemplo, CD79a o CD79b y VH y VL son específicos para CD22.

En una realización, el V1 es específico para CD22.

5 En una realización, el V2 es específico para CD22.

En una realización, el V1 y el V2 juntos (por ejemplo, en forma de un dominio de unión) son específicos para CD22 y VH y VL son específicos para CD79.

10 En una realización, el V1 es específico para CD22, el V₂ es específico para albúmina y VH y VL son específicos para CD79.

En una realización, el V1 es específico para albúmina, V₂ es específico para CD22 y VH y VL son específicos para CD79.

15 En una realización, el V1 es específico para CD79, el V₂ es específico para albúmina y VH y VL son específicos para CD22.

20 En una realización, el V1 es específico para albúmina, el V₂ es específico para CD79 y VH y VL son específicos para CD22.

En una realización, el V1 es un dsscFv específico para CD22, el V₂ es un dsscFv específico para albúmina y VH y VL son específicos para CD79.

25 En una realización, el V1 es un dsscFv específico para albúmina, el V₂ es un dscFv específico para CD22 y VH y VL son específicos para CD79.

En una realización, el V1 es un dsscFv específico para CD79, el V₂ es un dsscFv específico para albúmina y VH y VL son específicos para CD22.

En una realización, el V₁ es un dsscFv específico para albúmina, el V₂ es un dsscFv específico para CD79 y V_H y V_L son específicos para CD22.

5 V₁, V₂, V_H y V_L en las construcciones anteriores pueden representar un dominio de unión e incorpora cualquiera de las secuencias proporcionadas en el presente documento.

X e Y representan cualquier enlazador adecuado, por ejemplo, X e Y pueden ser independientemente SGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 271) o SGGGGTGGGS (SEQ ID NO: 272).

En una realización, cuando V₁ y/o V₂ son un dab, dsFv o un dsscFv, se forma el enlace disulfuro entre los dominios variables V_H y V_L de V₁ y/o V₂ entre las posiciones V_H44 y V_L100.

15 En los casos donde uno o más pares de regiones variables en una molécula de anticuerpo multiespecífico comprende un enlace disulfuro entre V_H y V_L, este puede encontrarse en cualquier posición adecuada, tal como entre dos de los restos listados a continuación (a menos que el contexto indique lo contrario, se emplea la numeración de Kabat en la lista a continuación). En los casos donde se hace referencia a la numeración de Kabat, la referencia relevante es Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU.

En una realización, el enlace disulfuro se encuentra en una posición seleccionada entre el grupo que comprende:

- V_H37 + V_L95C véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu *et al* (1997);

• V_H44 + V_L100 véase, por ejemplo, Biochemistry 33 5451-5459 Reiter et al (1994); o Journal of Biological Chemistry Vol. 269 n.º 28 págs.18327-18331 Reiter et al (1994); o Protein Engineering, vol. 10 n.º 12 págs.1453-
5 1459 Rajagopal et al (1997);

• V_H44 + V_L105 véase, por ejemplo, J Biochem. 118, 825-831 Luo et al (1995);

• V_H45 + V_L87 véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);
10

• V_H55 + V_L101 véase, por ejemplo, FEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995);

• V_H100 + V_L50 véase, por ejemplo, Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber et al (1990);

• V_H100b + V_L49;
15

• V_H98 + V_L 46 véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);

• V_H101 + V_L46;

• V_H105 + V_L43 véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 págs.7538-7542 Brinkmann et al (1993); o
20 Proteins 19, 35-47 Jung et al (1994),

• V_H106 + V_L57 véase, por ejemplo, FEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995)

y una posición correspondiente a las mismas en un par
25 de región variable ubicado en la molécula.

En una realización, el enlace disulfuro se forma entre las posiciones V_H44 y V_L100.

"Monoespecífico", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a la capacidad para unirse a un
30 antígeno diana solo una vez.

Por lo tanto, en una realización, las moléculas multiespecíficas de la presente invención son monoespecíficas para cada antígeno.

Por lo tanto, en una realización, los dominios de unión de las moléculas multiespecíficas de acuerdo con la presente divulgación son monoespecíficas. Esto es ventajoso en algunas realizaciones terapéuticas debido a que las moléculas de la divulgación no son capaces de sobrecruzarse con el antígeno mediante la unión al antígeno diana más de una vez. Por lo tanto, en una realización, las moléculas multiespecíficas de la presente divulgación no son capaces de sobrecruzarse mediante la unión a la misma diana dos veces en dos ubicaciones diferentes, por ejemplo, en la misma célula o en dos células diferentes.

El sobrecruzamiento, en particular en relación con CD79b en la misma célula o en células diferentes, puede generar señales *in vivo* que por ejemplo, estimulan la actividad del antígeno diana.

En un ejemplo, las moléculas multiespecíficas de la presente invención contienen no más de un dominio de unión para CD22 y no más de un dominio de unión para CD79. Cada dominio de unión es monoespecífico.

Por lo tanto, en un ejemplo, la molécula multiespecífica es monovalente para CD22 y monovalente para CD79.

En una realización, cada anticuerpo o fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas multiespecíficas de la presente divulgación es monovalente.

Por lo tanto, en una realización, los dominios de unión de las moléculas multiespecíficas de la presente divulgación son monovalentes.

Por lo tanto, en una realización, los dominios de unión de las moléculas multiespecíficas de la presente divulgación son monovalentes y monoespecíficas.

En una realización, la molécula multiespecífica de la presente divulgación está formada por dos o más dominios de unión monoespecíficos y monovalentes, tales como Fab, Fab', scFv, VH, VL, VHH, Fv, dsFv, combinados o unidos de cualquier modo adecuado, para construir una molécula multiespecífica, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En otra realización, por ejemplo donde las moléculas de la divulgación comprende al menos tres dominios de unión, dos o tres dominios de unión (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos o una combinación de un anticuerpo y un fragmento) pueden tener diferentes especificidades de antígeno, por ejemplo, unión a tres antígenos diana diferentes.

REGIONES CONSTANTES

Los dominios de región constante de anticuerpo de un anticuerpo de la presente divulgación, en caso de estar presente, por ejemplo en un anticuerpo de longitud completa o una molécula multiespecífica, puede seleccionarse teniendo en consideración la función propuesta de la molécula de anticuerpo y en particular, las funciones efectoras que puedan necesitarse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, pueden usarse dominios de región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está pensada para usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse

los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está pensada para fines terapéuticos y no se necesitan funciones efectoras de anticuerpo.

Se apreciará que también puede usarse las variantes de
5 secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, pueden usarse moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado a prolina, tal como se describe en Angal et al., 1993, Molecular Immunology, 1993, 30:105-108. Por consiguiente, en la
10 realización donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, el anticuerpo puede incluir la mutación S241P.

En una realización, la cadena pesada de anticuerpo comprende un dominio CH₁ y la cadena ligera de anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

15 En una realización, la cadena pesada de anticuerpo comprende un dominio CH₁, un dominio CH₂ y un dominio CH₃ y la cadena ligera de anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

Los cuatro isotipos de IgG humanos se unen a los
20 receptores activadores de Fcγ (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), al receptor inhibidor FcγRIIb y al primer componente del complemento (C1q) con diferentes afinidades, proporcionando funciones efectoras muy diferentes (Bruhns P. et al., 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and
25 their polymorphic variants for human IgG subclasses. Blood. 113(16):3716-25), véase también Jeffrey B. Stavenhagen, et al. *Cancer Research* 15 de septiembre de 2007; 67(18):8882-90.

La unión de IgG a los FcγR o a C1q depende de los
30 restos ubicados en la región bisagra y el dominio CH₂. Dos regiones del dominio CH₂ son críticas para la unión a los

FcγR y Clq y tienen secuencias únicas en IgG2 e IgG4. Se ha demostrado que las sustituciones en IgG1 de restos de IgG2 en las posiciones 233-236 y de restos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reducen en gran medida la ADCC y la CDC (Armour KL. *et al.*, 1999. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24 y Shields RL. *et al.*, 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604). Además, Idusogie *et al.* demostraron que la sustitución de alanina en diferentes posiciones, incluyendo K322, redujo significativamente la activación del complemento (Idusogie EE. *et al.*, 2000. Mapping of the Clq binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 164(8):4178-84). De manera similar, se ha demostrado que las mutaciones en el dominio CH₂ de IgG2A murina reducen la unión a FcγRI y Clq (Steurer W. *et al.*, 1995. *Ex vivo* coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *J Immunol.* 155(3):1165- 74).

En una realización, se muta la región Fc empleada, en particular, una mutación descrita en el presente documento. En una realización, la mutación es para eliminar la unión y/o la función efectora.

En una realización, la mutación de Fc se selecciona entre el grupo que comprende una mutación para eliminar la unión de la región Fc, una mutación para aumentar o eliminar una función efectora, una mutación para aumentar la semivida y una combinación de las mismas.

Algunos anticuerpos que se unen de manera selectiva a FcRn a pH 6.0 pero no a pH 7.4 muestran una semivida mayor en una serie de modelos animales. Varias mutaciones ubicadas en la interfaz entre los dominios CH₂ y CH₃, tales como T250Q/M428L (Hinton PR. *et al.*, 2004. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. J Biol Chem. 279(8):6213-6) y M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (Vaccaro C. *et al.*, 2005. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate *in vivo* antibody levels. Nat Biotechnol. 23(10):1283-8), han demostrado aumentar la afinidad de unión a FcRn y la semivida de IgG1 *in vivo*.

Sin embargo, no siempre hay una relación directa entre el aumento de la unión a FcRn y una mejora de la semivida (Datta-Mannan A. *et al.*, 2007. Humanized IgG1 Variants with Differential Binding Properties to the Neonatal Fc Receptor: Relationship to Pharmacokinetics in Mice and Primates. Drug Metab. Dispos. 35: 86 - 94).

La subclase IgG4 muestra unión reducida al receptor de Fc (FcγRIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG generalmente muestran una fuerte unión. Puede obtenerse unión reducida a receptor en estos otros subtipos de IgG alterando, por ejemplo, reemplazando uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que comprende Pro238, Aps265, Asp270, Asn270 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435.

En una realización, una molécula de acuerdo con la presente divulgación tiene un Fc de subclase IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3 en donde el Fc se muta en una, dos o toras las posiciones siguientes S228, L234 y/o D265.

En una realización, las mutaciones en la región Fc se seleccionan independientemente entre S228P, L234A, L235A, L235A, L235E y combinaciones de las mismas.

5 Puede desearse reducir o aumentar la función efectora de una región Fc. Se necesitan anticuerpos que se dirigen a moléculas de la superficie celular, especialmente aquellas en células inmunitarias, que supriman funciones efectoras. En algunas realizaciones, por ejemplo para el tratamiento de la autoinmunidad, puede ser deseable una unión a Fc
10 mejorada en las células inmunitarias aumentando la unión negativa al receptor de Fc (FcγRIIb o CD32b), véase Stavenhagen JB, et al *Advances in Enzyme Regulation* 3 de diciembre de 2007 y Veri MC, et al. *Arthritis Rheum*, 30 de marzo de 2010;62(7):1933-43. Por el contrario, para los
15 anticuerpos previstos para su uso en oncología, el aumento de las funciones efectoras puede mejorar la actividad terapéutica.

Se han efectuado numerosas mutaciones en el dominio CH₂ de IgG1 humana y se ha probado su efecto en la ADCC y
20 la CDC *in vitro* (Idusogie EE. et al., 2001. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol.* 166(4):2571-5). De manera destacable, se ha comunicado que la sustitución de la alanina en la posición 333 aumenta tanto la ADCC como la CDC. Lazar et al.
25 describieron un triple mutante (S239D/I332E/A330L) con una mayor afinidad por FcγRIIIa y una menor afinidad por FcγRIIb que da como resultado una ADCC mejorada (Lazar GA. et al., 2006. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *PNAS* 103(11): 4005-4010). Se usaron las
30 mismas mutaciones para generar un anticuerpo con ADCC aumentada (Ryan MC. et al., 2007. Antibody targeting of B-

cell maturation antigen on malignant plasma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 6: 3009 - 3018). Richards *et al.* estudiaron un triple mutante ligeramente diferente (S239D/I332E/G236A) con afinidad mejorada por FcγRIIIa y una relación
5 FcγRIIIa/FcγRIIb que media una fagocitosis mejorada de las células diana por parte de macrófagos (Richards JO *et al* 2008. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 7(8):2517-27).

10 Debido a su carencia de funciones efectoras, los anticuerpos IgG4 representan una subclase de IgG adecuada para el bloqueo del receptor sin eliminación de células. Las moléculas de IgG4 pueden intercambiar medias moléculas en un proceso dinámico denominado intercambio de brazos de
15 Fab. Este fenómeno puede producirse entre anticuerpos terapéuticos e IgG4 endógenas. Se ha demostrado que la mutación S228P previene este proceso de recombinación, permitiendo el diseño de anticuerpos terapéuticos IgG4 menos impredecibles (Labrijn AF. *et al.*, 2009. Therapeutic
20 IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 27(8):767-71). Puede emplearse esta tecnología para crear moléculas de anticuerpo biespecíficas.

Un experto en la materia también entenderá que los
25 anticuerpos pueden sufrir una serie de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones normalmente depende de la línea celular hospedadora usada para expresar el anticuerpo, así como las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden
30 incluir variaciones en la glucosilación, la oxidación de metionina, la formación de dicetopiperazina, la

isomerización de aspartato y la desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un resto básico carboxilo terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo puede estar ausente.

AFINIDAD

Las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación comprenden al menos un dominio de unión que es específico para CD22.

Las moléculas multiespecíficas de la presente invención comprenden un dominio de unión específico para el antígeno CD22 y un dominio de unión específico para el antígeno CD79a y/o CD79b.

En una realización, un dominio de unión empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD22.

En una realización, un dominio de unión empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD79a.

En una realización, un dominio de unión empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para CD79b.

En una realización, un dominio de unión empleado en las moléculas de la presente divulgación es específico para el complejo de CD79, es decir, reconoce un epítipo presente en el complejo y es específico para el mismo, por ejemplo, un epítipo que comprende una interacción entre CD79a y CD79b.

El dominio de unión para CD79 puede unirse a CD79a y/o a CD79b.

CD79a (también conocido como cadena alfa de proteína asociada a complejo de receptor de antígeno de linfocitos B e inmunoglobulina alfa) es una proteína conocida. La expresión de CD79a está restringida a los linfocitos B. La secuencia humana se encuentra disponible en UniProt, con la entrada P11912 (SEQ ID NO: 162 y sin secuencia de señal, los aminoácidos 33-226 de la SEQ ID NO: 162). La versión murina está disponible en UniProt con la entrada 11911. La presente divulgación se refiere a todas las formas de CD79a, de cualquier especie, en particular la humana y cualquier variante natural de las mismas. En una realización, CD79a se refiere a la forma humana de la proteína.

CD79b (también conocido como asociado a inmunoglobulina beta y agrupación de diferenciación 79B) es una proteína conocida. La expresión de CD79b está restringida a los linfocitos B. La secuencia humana se encuentra disponible en UniProt con la entrada P40259 (SEQ ID NO: 163 y sin la secuencia de señal, los aminoácidos 29-229 de la SEQ ID NO: 163). La versión murina es la entrada de UniProt P15530. La presente divulgación se refiere a todas las formas de CD79b, de cualquier especie, en particular la humana y cualquier variante natural de las mismas. En una realización, CD79b se refiere a la forma humana de la proteína.

En una realización, el dominio de unión específico para CD79 se une a CD79a.

En una realización, el dominio de unión específico para CD79 se une a CD79b.

En una realización, el dominio de unión específico para CD79 se une a un complejo de CD79a y CD79b.

En una realización, la afinidad del dominio de unión por CD79 en una molécula de la presente divulgación es de
5 aproximadamente 100nM o más fuerte, tal como aproximadamente 50nM, 20nM, 10nM, 1nM, 500pM, 250pM, 200pM, 100pM o más fuerte, en particular, una afinidad de unión de 50pM o más fuerte.

En una realización, la afinidad del dominio de unión
10 por CD79a en una molécula de la presente divulgación es de aproximadamente 100nM o más fuerte, tal como aproximadamente 50nM, 20nM, 10nM, 1nM, 500pM, 250pM, 200pM, 100pM o más fuerte, en particular, una afinidad de unión de 50pM o más fuerte.

En una realización, la afinidad del dominio de unión
15 por CD79b en una molécula de la presente divulgación es de aproximadamente 100nM o más fuerte, tal como aproximadamente 50nM, 20nM, 10nM, 1nM, 500pM, 250pM, 200pM, 100pM o más fuerte, en particular, una afinidad de unión de
20 50pM o más fuerte.

Se apreciará que la afinidad del dominio de unión por CD22 puede ser igual o diferente a la afinidad del dominio de unión por CD79.

En una realización, las moléculas de anticuerpo
25 multiespecífico de la presente divulgación o los componentes del anticuerpo/fragmento de las mismas se procesan para proporcionar afinidad mejorada por un antígeno o antígenos diana. Dichas variantes pueden obtenerse mediante una serie de protocolos de maduración
30 por afinidad, incluyendo la mutación de las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), reordenamiento de

5 cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), reordenamiento de ADN (Patten et al Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), presentación en fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (citado anteriormente) comentan estos métodos de maduración por afinidad.

ANTICUERPOS Y GENERACIÓN DE LOS MISMOS

10 Los dominios de unión para su uso en la presente invención pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pueden tomarse las CDR de anticuerpos no humanos, incluyendo anticuerpos disponibles comercialmente e injertarse en
15 armazones humanos o como alternativa, pueden generarse anticuerpos quiméricos con regiones variables no humanas y regiones constantes humanas, etc.

Típicamente, los dominios de unión para su uso en la presente invención son dominios de unión procedentes de
20 anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado, tales como anticuerpos que se unen a CD22 o CD79a y/o CD79b.

Se conocen en la técnica ejemplos de anticuerpos para CD22 y CD79 y pueden emplearse estos directamente en las moléculas de la presente invención o comprobarse si son
25 adecuados usando los métodos descritos en el presente documento y posteriormente, en caso necesario, modificarse, por ejemplo, humanizarse usando los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos para CD22 en uso clínico incluyen epratuzimab e inotuzumab. Se han
30 descrito otros anticuerpos terapéuticos en la técnica, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD22 descritos en los

documentos US2003202975 y WO14/011520 y los anticuerpos anti-CD79b divulgados en los documentos WO14011521 y WO15021089. Los anticuerpos anti-CD22 no humanos incluyen los anticuerpos monoclonal de conejo LS-C2210357 (LSBio) del clon SP104, monoclonal de ratón LS-C174778 del clon 4C3, monoclonal de ratón LS-C4802, monoclonal de ratón LS-B9996 del clon 1B1, monoclonal de ratón LS-C340404 del clon 2E6, monoclonal de ratón LS-C312263, monoclonal de ratón LS-C152867, monoclonal de ratón LS-C87523, monoclonal de ratón LS-C134333 del clon FRB4, monoclonal de ratón LS-C134336, monoclonal de ratón LS-C40961 del clon HIB22, monoclonal de ratón LS-C134332, los siguientes anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology sc-271579, sc-377304, sc-7032, sc-18909, sc-7932, sc-7323, sc-7307, sc-7031, sc-20053, sc-189000, sc-136440, sc-136507, sc-53031, sc-73363, sc-53032, monoclonal de conejo de Abcam Ab33859 (EP498Y), el anticuerpo monoclonal de ratón AA 1-687, número de catálogo ABIN1999423, monoclonal de ratón de Biolegend, número de taller V CD22.14 del clon HIB22.

Los anticuerpos anti-CD79a disponibles comercialmente incluyen los anticuerpos monoclonal de ratón LS-B4504 (LSBio) del clon HM57, monoclonal de ratón LS-B8330, monoclonal de ratón LS-C44954, monoclonal de conejo LS-B9093, monoclonal de ratón LS-B8513 del clon JCB117, monoclonal de conejo LS-C210607 del clon SP18, monoclonal de ratón LS-C175441 del clon 5E2, monoclonal de ratón LS-C338670 del clon 3D3, monoclonal de ratón LS-C88120 del clon HM47/A9, monoclonal de ratón LS-C191714, monoclonal de ratón LS-C87592, monoclonal de ratón LS-C44955, monoclonal de ratón LS-C95934, monoclonal de ratón LS-C121584, monoclonal de ratón LS-C121585, monoclonal de ratón LS-

C204347, monoclonal de ratón LS-C88122, monoclonal de ratón de Abcam ab3121 [HM47/A9], monoclonal de conejo ab79414 y monoclonal de conejo ab133483.

Los anticuerpos para CD79b comercialmente disponibles
5 incluyen los anticuerpos monoclonal de ratón de Abcam ab33295, monoclonal de rata ab23826, monoclonal de ratón ab103422, monoclonal de conejo ab134103, monoclonal de conejo ab134147 y monoclonal de conejo ab183343.

Dichos anticuerpos disponibles comercialmente pueden
10 ser herramientas útiles para el descubrimiento de anticuerpos terapéuticos adicionales.

El experto en la materia puede generar anticuerpos para su uso en las moléculas multiespecíficas de la invención usando cualquier método adecuado conocido en la
15 técnica.

Los polipéptidos antigénicos para su uso en la generación de anticuerpos para su uso, por ejemplo, para inmunizar a un hospedador o para su uso en paneo, tal como en presentación en fagos, pueden prepararse mediante
20 procesos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedadoras modificadas por ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y
25 proteínas. Estos se usan de manera indistinta a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido antigénico puede formar parte en algunos casos de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión fusionada, por ejemplo, a un marcador de afinidad o similares. En una
30 realización, el hospedador puede inmunizarse con una célula, tal como un fibroblasto, transfectado con la proteína o el

polipéptido relevante, por ejemplo, co-transfectado con CD79a y CD79b.

Pueden obtenerse anticuerpos generados contra un polipéptido antigénico, en caso de que sea necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal, preferentemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Puede inmunizarse a muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos. Sin embargo, generalmente son más adecuados los ratones, los conejos, los cerdos y las ratas.

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

También pueden generarse anticuerpos usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales, clonando y expresando los ADNc de región variable de inmunoglobulinas generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481; documentos WO92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los anticuerpos para su uso en la presente divulgación también pueden generarse usando diversos métodos de

presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen aquellos divulgados por Brinkman *et al.* (en *J. Immunol. Methods*, 1995, 182: 41-50), Ames *et al.* (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24:952-958), Persic *et al.* (*Gene*, 1997 187 9-18), Burton *et al.* (*Advances in Immunology*, 1994, 57:191-280), los documentos WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; los documentos US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; 5,969,108, y el documento WO20011/30305.

En un ejemplo, las moléculas multiespecíficas de la presente divulgación son completamente humanas, en particular, uno o más de los dominios variables son completamente humanos.

Las moléculas completamente humanas son aquellas en las que todas las regiones variables y las regiones constantes (cuando estén presentes) de las cadenas tanto pesadas como ligeras son de origen humano o son sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de región variable y opcionalmente de región constante de inmunoglobulina murinos se han reemplazado por sus homólogos humanos, por ejemplo, tal como se describe de manera general en los documentos EP0546073, US5,545,806,

US5,569,825, US5,625,126, US5,633,425, US5,661,016,
US5,770,429, EP 0438474 y EP0463151.

En un ejemplo, los dominios de unión de las moléculas
multiespecíficas de acuerdo con la divulgación están
5 humanizados.

Humanizado (que incluye anticuerpos con injertos de
CDR), tal como se emplea en el presente documento, se
refiere a moléculas que tienen una o más regiones
determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie
10 no humana y una región de armazón procedente de una
molécula de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo,
los documentos US 5,585,089; WO91/09967). Ha de tenerse en
cuenta que puede ser necesario transferir únicamente los
restos determinantes de la especificidad de las CDR en
15 lugar de la CDR completa (véase, por ejemplo, Kashmiri et
al., 2005, Methods, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados
pueden comprender además opcionalmente uno o más restos de
armazón procedentes de la especie no humana de la que se
obtuvieron las CDR.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión
"molécula de anticuerpo humanizada" se refiere a una
molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera
contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más
CDR modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un
25 anticuerpo monoclonal murino) injertadas en un armazón de
región variable de cadena pesada y/o ligera de un
anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano).
Para consultar un artículo de revisión, véase Vaughan et al.,
Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una realización,
30 en lugar de transferir toda la CDR, solo se transfieren al
armazón del anticuerpo humano uno o más de los restos

determinantes de la especificidad procedentes de cualquiera de las CDR descritas anteriormente en el presente documento (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). En una realización, se transfieren al armazón de anticuerpo humano únicamente los restos determinantes de la especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente en el presente documento. En otra realización, solo se transfieren al armazón del anticuerpo humano los restos determinantes de la especificidad procedentes de cada una de las CDR descritas anteriormente en el presente documento.

Cuando se injertan las CDR o los restos determinantes de la especificidad, se puede utilizar cualquier secuencia adecuada de armazón de la región variable aceptora, teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante del que se obtienen las CDR, incluyendo las regiones de armazón de ratón, primate y ser humano. De manera adecuada, el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones de armazón aceptoras humanas así como una o más de las CDR proporcionadas en el presente documento.

Los ejemplos de armazones humanos que pueden usarse en la presente divulgación son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., citado anteriormente). Por ejemplo, para la cadena pesada pueden usarse KOL y NEWM, para la cadena ligera puede usarse REI y tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera pueden usarse EU, LAY y POM. Como alternativa, pueden usarse secuencias de línea germinal humanas; estas se encuentran disponibles en: <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>.

En una molécula de anticuerpo humanizada de la presente divulgación, las cadenas pesada y ligeras no tienen que proceder necesariamente del mismo anticuerpo y si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que
5 tienen regiones de armazón procedentes de diferentes cadenas.

Las regiones de armazón no han de tener exactamente la misma secuencia que aquellas del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, pueden cambiarse los restos inusuales por restos
10 de aparición más frecuente para esa clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, pueden cambiarse restos seleccionados en las regiones de armazón aceptoras de tal forma que correspondan al resto hallado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann *et al*
15 1998, *Nature*, 332, 323-324). Dichos cambios deben mantenerse en el mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En el documento WO91/09967 se expone un protocolo para seleccionar restos en las regiones de armazón aceptoras que puede ser necesario
20 cambiar.

Los derivados de los armazones pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos reemplazados por un aminoácido alternativo, por ejemplo, con un resto donante.

Los restos donantes son restos procedentes del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo del que se obtuvieron originalmente las CDR, en particular, se adopta el resto en una ubicación correspondiente de la secuencia donante. Los restos donantes pueden reemplazarse por un resto adecuado procedente de un armazón receptor humano
30 (restos aceptores).

Los restos en los dominios variables de anticuerpo se numera convencionalmente de acuerdo con un sistema diseñado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5 US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. (en lo sucesivo "Kabat *et al.* (anteriormente citado)"). En la presente memoria descriptiva se utiliza este sistema de numeración excepto cuando se indique de otro modo.

Las denominaciones de restos de Kabat no siempre 10 corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácido. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que en la numeración estricta de Kabat corresponderían a un acortamiento o a una inserción de un 15 componente estructural, ya sea una región de armazón o determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. Puede determinarse la numeración correcta de Kabat para un anticuerpo dado por alineamiento de restos de homología en la secuencia del 20 anticuerpo con una secuencia con numeración de Kabat "estándar".

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada están localizadas en los restos 31-35 (CDR-H1), los restos 50-65 (CDR-H2) y los restos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el 25 sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a la CDR-H1 se extiende desde el resto 26 al resto 32. Por tanto a menos que se indique de otro modo "CDR-H1" tal como se emplea en el 30 presente documento pretende referirse a los restos 26 a 35, tal como se describe por una combinación del sistema de

numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia.

Las CDR del dominio variable de la cadena ligera están localizadas en los restos 24-34 (CDR-L1), los restos 50-56
5 (CDR-L2) y los restos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

En un ejemplo, se proporciona un dominio de unión, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, que comprende una región variable de cadena
10 pesada (por ejemplo, VH), específica para CD79 que comprende tres CDR, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 158, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 159 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 160.

15 En una realización, se proporciona un domino de unión, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, que comprende una región variable de cadena pesada (por ejemplo, VH) específica para CD79 que comprende 3 CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 175 para CDRH1, SEQ ID
20 NO: 176 para CDRH2 y SEQ ID NO: 177 para CDRH3.

En una realización, se proporciona un domino de unión, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, que comprende una región variable de cadena ligera (por ejemplo, VL) específica para CD79 que comprende
25 3 CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 161 para CDRL1, SEQ ID NO: 162 para CDRL2 y SEQ ID NO: 163, 164, 165 o 166 para CDRL3.

En una realización, se proporciona un domino de unión, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, que comprende una región variable de cadena
30 ligera (por ejemplo, VL) específica para CD79 que comprende

3 CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 178 para CDRL1, SEQ ID NO: 179 para CDRL2 y SEQ ID NO: 180, 181, 182 o 183 para CDRL3.

En un ejemplo, se proporciona un dominio de unión, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, que comprende una región variable de cadena pesada (VH), específica para CD79 que comprende tres CDR, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 158, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 159 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 160 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende tres CDR, en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 161, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 162 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 163, 164, 165 o 166.

En un ejemplo, se proporciona un dominio de unión, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, que comprende una región variable de cadena pesada (VH), específica para CD79 que comprende tres CDR, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 175, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 176 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 177 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende tres CDR, en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 178, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 179 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 180, 181, 182 o 183.

En una realización se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende una VH y una VL específicas para

CD79b seleccionada entre las SEQ ID NO: 171 y 173, 171 y 174, 172 y 173, 172 y 174, 188 y 189 y 188 y 190.

Las secuencias de estos anticuerpos anti-CD79 (anticuerpo 4447 y anticuerpo 4450), que incluyen las
5 secuencias de VH, VL y CDR se proporcionan en el presente documento en la figura 35. Las secuencias de los anticuerpos anti-CD22 (anticuerpos 4120, 4126, 4127, 4128, 4130, 4132) que incluyen las secuencias de VH, VL y CDR se proporcionan en el presente documento en la figura 35,
10 estas pueden combinarse como dominios de unión en moléculas de la presente invención.

En una realización, se proporciona un dominio variable o un dominio de unión que comprende un par de dominios variables con una secuencia divulgada en el presente
15 documento o una variante de la misma.

En un ejemplo, se proporciona un dominio de unión específico para albúmina que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 240 y una región variable de cadena ligera
20 (VL) que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 242.

En una realización, el dominio o los dominios de unión están humanizados.

En un ejemplo, pueden modificarse una o más CDR proporcionadas en el presente documento para eliminar
25 restos o sitios no deseados, tales como restos de cisteína o sitios de isomerización de ácido aspártico (D) o sitios de desamidación de asparagina (N).

Por ejemplo, pueden sustituirse uno o más restos de
30 cisteína en una cualquiera de las CDR por otro aminoácido, tal como serina.

En un ejemplo, puede eliminarse un sitio de desamidación de asparagina de una o más CDR mutando el resto de asparagina (N) y/o un resto próximo por cualquier otro aminoácido adecuado. En un ejemplo, puede mutarse un
5 sitio de desamidación de asparagina, tal como NG o NS, por ejemplo a NA o NT.

En un ejemplo, puede eliminarse un sitio de isomerización de ácido aspártico de una o más CDR mutando el resto de ácido aspártico (D) y/o un resto próximo por
10 cualquier otro aminoácido adecuado. En un ejemplo, puede mutarse un sitio de isomerización de ácido aspártico, tal como DG o DS, por ejemplo, a EG, DA o DT.

En un ejemplo, puede eliminarse un sitio de N-glucosilación, tal como NLS, mutando el resto de asparagina por cualquier otro aminoácido adecuado, por ejemplo, a SLS
15 o QLS. En un ejemplo, puede eliminarse un sitio de N-glucosilación, tal como NLS, mutando el resto de serina (S) por cualquier otro resto, con la excepción de treonina (T).

El experto en la materia será capaz de probar
20 variantes de CDR o secuencias humanizadas en cualquier ensayo adecuado, tal como aquellos descritos en el presente documento, para confirmar que se mantiene la actividad.

Puede probarse la unión específica al antígeno usando cualquier ensayo adecuado, incluyendo, por ejemplo, métodos
25 ELISA o de resonancia de plasmón superficial, tal como BIAcore, donde puede medirse la unión al antígeno (CD22 o CD79). Dichos ensayos pueden usar CD22 o CD79 natural o recombinante aislado (a y/o b) o una proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, se mide la unión usando
30 CD22 recombinante (tal como la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 244 o los aminoácidos 20-847 de la SEQ ID NO:

244) o CD79 (tal como la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 245 y la SEQ ID NO: 246 y los aminoácidos 33-226 de la SEQ ID NO: 245 y los aminoácidos 29-229 de la SEQ ID NO: 246) mediante, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, tal como BIAcore. Como alternativa, pueden expresarse las proteínas en una célula, tal como una célula HEK y medirse la afinidad empleando una determinación de afinidad basada en citometría de flujo.

Los anticuerpos que bloquean de manera cruzada la unión de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención a CD22, en particular, una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 107, 108, 109 o 110 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 106; o una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 o 121 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 115; o una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 127, 128, 129 o 130 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 126; o una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 136, 137, 138 o 139 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 135; o una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 145, 146, 147 o 148 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 144; o una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 154, 155, 156 o 157 y la secuencia de cadena ligera

proporcionada en la SEQ ID NO: 153 pueden ser útiles de manera similar para la unión a CD22 y por lo tanto, útiles de manera similar en las moléculas de anticuerpo, tales como las moléculas multiespecíficas de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo, tal como una molécula multiespecífica, que comprende un dominio de unión específico para el antígeno CD22 y un dominio de unión específico para el antígeno CD79b, en donde el dominio de unión para CD22 bloquea de manera cruzada la unión de una cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas anteriormente en el presente documento a CD22 y/o se bloquea de manera cruzada la unión a CD22 por parte de uno cualquiera de estos anticuerpos. En una realización, dicho anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo descrito anteriormente en el presente documento. En otra realización, el anticuerpo de bloqueo cruzado se une a un epítipo que limita y/o solapa con el epítipo unido a un anticuerpo descrito anteriormente en el presente documento.

En otra realización, el anticuerpo neutralizante de bloqueo cruzado se une a un epítipo que limita y/o solapa con el epítipo unido a un anticuerpo descrito anteriormente en el presente documento.

Los anticuerpos de bloqueo cruzado pueden identificarse usando cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo, usando ensayos ELISA de competición o BIAcore, donde la unión del anticuerpo de bloqueo cruzado al antígeno (CD22 y/o CD79) impide la unión de un anticuerpo de la presente invención o viceversa. Dichos ensayos de bloque cruzado pueden usar CD22 o CD79 natural o recombinante aislado expresado en células (a y/o b) o una

proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, se mide la unión y el bloqueo cruzado usando CD22 recombinante o un fragmento o una variante natural adecuada del mismo (tal como la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 244 o la secuencia proporcionada en los aminoácidos 20-847 de la SEQ ID NO: 244) o CD79 tal como la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:245 o la secuencia proporcionada en los aminoácidos 33-226 de la SEQ ID NO: 245 (CD79a) y/o la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO:246 o la secuencia proporcionada en los aminoácidos 29-229 de la SEQ ID NO: 246, por ejemplo, en un 85% o más, tal como un 90% o más, en particular, en un 95% o más.

Dichos anticuerpos de bloqueo cruzado pueden tener una actividad comparable en uno o más ensayos funcionales a la de las moléculas de anticuerpo multiespecíficas descritas en el presente documento.

La presente divulgación también se extiende a nuevas secuencias de polipéptido divulgadas en el presente documento y a secuencias al menos un 80% similares o idénticas a las mismas, por ejemplo, con una similitud o identidad del 85% o mayor, tal como del 90% o mayor, en particular, del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o mayor.

"Identidad", tal como se usa en el presente documento, indica que en cualquier posición concreta en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", tal como se usa en el presente documento, indica que en cualquier posición concreta en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o

valina. Otros aminoácidos que pueden sustituirse a menudo entre sí incluyen, pero sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- 5 - lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen
- 10 cadenas laterales de amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M.,
15 ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in
20 Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el programa informático BLAST™ disponible en el NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. y States, D.J. 1993,
25 Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

ENLAZADORES

30 La enseñanza en el presente documento de enlazadores en un contexto puede aplicarse igualmente a enlazadores en

diferentes contextos donde se emplea un enlazador, tal como en cualquier molécula multiespecífica de la presente invención.

En una realización, el enlazador empleado en una molécula de la divulgación es un enlazador aminoacídico de 50 restos o menos de longitud, por ejemplo, seleccionado entre una secuencia mostrada en las secuencias 251 a 314.

Tabla 1. Secuencias enlazadoras de bisagra

SEQ ID NO:	SECUENCIA
208	DKHTCAA
209	DKHTCPCPA
210	DKHTCPCPCATCPCPA
211	DKHTCPCPCATCPCPCATCPCPA
212	DKHTCPCPCAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
213	DKHTCPCPCAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
214	DKHTCCVECPCPA
215	DKHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPA
216	DKHTCPSCPA

Tabla 2. Secuencias de enlazador flexible

SEQ ID NO:	SECUENCIA
217	SGGGGSE
218	DKHTS
219	(S) GGGGS
220	(S) GGGSGGGGS
221	(S) GGGSGGGSGGGGS
222	(S) GGGSGGGSGGGSGGGGS
223	(S) GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
224	AAAGSG-GASAS
225	AAAGSG-XGGGS-GASAS
226	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
227	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS

5	228	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
	229	AAAGSG-XS-GASAS
	230	PGGNRGTTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
	231	ATTTGSSPGPT
	232	ATTTGS
10	---	GS
	233	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
	234	GTVAAPSVFIFPPSD
	235	GGGGIAPSMVGGGGS
	236	GGGGKVEGAGGGGGS
15	237	GGGGSMKSHDGGGGS
	238	GGGGNLITIVGGGGS
	239	GGGGVVPSLPGGGGS
	240	GGEKSI PGGGGS
	241	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
20	242	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
	243	TPSHLSHILPSFGLPTFN
	244	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
	245	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
	246	APGPSAPSHRSLPSRAFG
25	247	PRNSIHFLHPLLVA PLGA
	248	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
	249	SPQYPSPLTTLTPPHPSL
	250	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
	251	LPWRTSLLPSLPLRRRP
30	252	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
	253	VPPAPVVSLRSAHARPPY
	254	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
	255	PNVAHVLP LLTV PWDNLR
	256	CNPLLPLCARSPAVRTEP

(S) es opcional en las secuencias 219-223

Los ejemplos de enlazadores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 273), PPPP (SEQ ID NO: 274) y PPP.

Otros enlazadores se muestran en la **tabla 3**:

5	SEQ ID NO:	SECUENCIA
	257	DLCLRDWGCLW
	258	DICLPRWGCLW
	259	MEDICLPRWGCLWGD
	260	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
10	261	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
	262	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
	263	EDICLPRWGCLWEDD
	264	RLMEDICLPRWGCLWEDD
	265	MEDICLPRWGCLWEDD
15	266	MEDICLPRWGCLWED
	267	RLMEDICLARWGCLWEDD
	268	EVRSFCTRWPAEKSKPLRG
	269	RAPESFVCYWETICFERSEQ
20	270	EMCYFPGICWM

MOLECULAS EFECTORAS

Si se desea, una molécula multiespecífica para su uso en la presente invención puede conjugarse a una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas unidas de modo que forman un único resto que puede unirse a las moléculas de la presente invención. Cuando se desee obtener un anticuerpo o una molécula multiespecífica de acuerdo con la presente divulgación unida a una molécula efectora, esta puede prepararse mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en los que el fragmento de anticuerpo se une

directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpos se conocen bien en la técnica (véase, Hellstrom *et al.*, *Controlled Drug Delivery*, 2^a Ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03/031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, la unión puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 86/01533 y EP0392745.

En una realización, las moléculas multiespecíficas de la presente divulgación pueden comprender una molécula efectora.

La expresión "molécula efectora", tal como se utiliza en el presente documento, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y sus fragmentos, por ejemplo, ADN, ARN y sus fragmentos, radionúclidos, en particular, yodo radiactivo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar mediante espectroscopía NMR o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos, incluyendo cualquier agente que es perjudicial (por ejemplo, elimina) células.

Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, 5 mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, 10 y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, 15 mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiaminplatino (II) (DDP), cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y 20 doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliceamicinas o duocarmicinas) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

25 Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados, tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , bismuto 213 , californio 252 , iridio 192 y wolframio 188 /renio 188 ; o fármacos, tales como, pero sin limitación, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

30 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero sin

limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas y transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o la toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina o un modificador de la respuesta biológica, tal como una linfoquina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnósticos. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales emisores de positrones (para su uso en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Véase de manera general la Patente de los Estados Unidos n.º 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse a anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen

umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes
5 adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aecuatorina; y los radionúclidos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar el suministro
10 del anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos que se unen a albúmina, tales como los descritos en el documento WO05/117984.

15 Cuando la molécula efectora es un polímero, en general, puede ser un polímero sintético o que existe en la naturaleza, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno opcionalmente sustituido de cadena lineal o ramificada o un polisacárido ramificado
20 o no ramificado, por ejemplo un homo o heteropolisacárido.

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

25 Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido,
30 tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

ENSAYOS FUNCIONALES

Típicamente, los dominios de unión adecuados para su uso en la presente invención pueden identificarse probando uno o más pares de dominio de unión en un ensayo funcional. Por ejemplo, puede probarse en un ensayo funcional una
5 molécula de anticuerpo anti-CD22, tal como una molécula multiespecífica que comprenda un dominio de unión específico para el antígeno CD22 y un dominio específico para el antígeno CD79a y/o CD79b.

Un "ensayo funcional", tal como se usa en el presente
10 documento, es un ensayo que puede usarse para determinar una o más propiedades o actividades deseadas de los complejos de proteína, complejos de anticuerpo o la mezcla de anticuerpos sometida a las condiciones de ensayo. Los ensayos funcionales adecuados pueden ser ensayos de unión,
15 ensayos de apoptosis, ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), ensayos de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), ensayos de inhibición del crecimiento o la proliferación celular (efecto citostático), ensayos de eliminación de células (efecto citotóxico),
20 ensayos de señalización celular, ensayos de producción de citocinas, producción de anticuerpos y cambio de isotipo y ensayos de diferenciación celular.

Puede compararse la eficacia de los anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la presente divulgación con
25 anticuerpos individuales o mezclas de anticuerpos (o fragmentos) en dichos modelos mediante métodos conocidos generalmente por un experto habitual en la materia.

Los ensayos funcionales pueden repetirse un número de veces según sea necesario para mejorar la fiabilidad de los
30 resultados. Pueden emplearse diversas pruebas estadísticas conocidas por el experto en la materia para identificar

resultados estadísticamente significativos y de este modo, identificar moléculas multiespecíficas con funciones biológicas.

Los ejemplos de ensayos funcionales adecuados se describen en los ejemplos en el presente documento e incluyen medir la capacidad de una molécula multiespecífica de la presente invención para inhibir la activación de linfocitos B después de su estimulación con un anti-IgM, medida detectando la inhibición de marcadores de la activación de linfocitos B, tales como la expresión de Akt fosforilada, la expresión de P38 fosforilada, la señalización de PLC γ , la expresión de CD40, la expresión de CD71 y/o la expresión de CD86.

En un ejemplo, una molécula de anticuerpo, tal como un anticuerpo multiespecífico de la presente invención, tiene una CI₅₀ menor de 5nM para la inhibición de la expresión de CD86 en linfocitos B estimulados con anti-IgM.

En una realización, pueden emplearse ensayos *in vivo*, tales como modelos animales, incluyendo modelos de tumor de ratón, modelos de enfermedades autoinmunitarias, modelos de roedor o primate infectados por virus o infectados por bacterias y similares, para probar las moléculas de la presente divulgación.

Las "proteínas de fusión", tal como se emplean en el presente documento, comprenden un componente proteico, por ejemplo, A o B, fusionado a otra entidad, por ejemplo, un compañero de unión X o Y (según sea adecuado). En una realización, la proteína de fusión es una proteína traduccional expresada mediante técnicas recombinantes a partir de una construcción genética, por ejemplo, expresada en un hospedador a partir de una construcción de ADN.

La función del anclaje X:Y es mantener próximas entre sí a las proteínas A y B, de tal forma que puede percibirse una función sinérgica de A y B.

"Anclaje heterodimérico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anclaje que comprende dos compañeros de unión X e Y diferentes que forman una interacción (tal como una unión) entre sí que tiene una afinidad general que es suficiente para mantener unidos a los dos compañeros de unión. En una realización, X y/o Y no son adecuados para formar homodímeros.

Anclado de manera heterodimérica y anclaje heterodimérico se usan de manera indistinta en el presente documento.

En una realización, "no adecuados para formar homodímeros", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a que la formación de los heterodímeros de X-Y es más preferible, por ejemplo, estable, tal como termodinámicamente estable y/o físicamente estable (por ejemplo, evidenciado por la ausencia de agregación), una vez que se ha formado.

En una realización, la interacción X-Y es más favorable que la interacción X-X o Y-Y. Esto reduce la formación de homodímeros X-X o Y-Y cuando se mezclan las proteínas de fusión A-X y B-Y. Esto hace que la eliminación de homodímeros sea relativamente simple, por ejemplo, una etapa de purificación, tal como una cromatografía en columna que proporciona proteínas de fusión y/o complejos de proteína biespecíficos de acuerdo con la presente invención sustancialmente puros.

En una realización, uno (o al menos uno) de los compañeros de unión es incapaz de formar un homodímero, por

ejemplo, se muta una secuencia de aminoácidos del compañero de unión para eliminar o minimizar la formación de homodímeros.

En una realización, los dos compañeros de unión son incapaces de formar un homodímero, por ejemplo, uno de los compañeros de unión es un péptido y el otro compañero de unión es una V_{HH} específica para dicho péptido.

En una realización, un scFv empleado en las moléculas de la presente divulgación es incapaz de formar un homodímero.

Incapaz de formar homodímeros, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una propensión de baja a nula a la formación de homodímeros. Baja, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un 5% o menor, tal como un 4, 3, 2, 1 o 0.5% o menor de agregado.

En una realización, ":" es una interacción de unión, por ejemplo, basada en fuerzas atractivas, tales como las fuerzas de van der Waals, tal como enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas, por ejemplo, basadas en la especificidad del anticuerpo por un antígeno, tal como un péptido.

En una realización, ":" no es un enlace covalente.

"Formar el complejo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una interacción, incluyendo una interacción de unión o una reacción química, que es suficientemente específica y fuerte cuando los componentes de la proteína de fusión A-X y B-Y se ponen en contacto en condiciones adecuadas, de tal forma que se ensambla el complejo y se mantienen unidas las proteínas de fusión.

"Mantenerse unidas", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a que los componentes (las proteínas

de fusión) se mantienen próximos entre sí, de tal forma que tras la unión puede manipularse el complejo como si fuese una molécula y en muchos casos, se comporta y actúa como una sola molécula. En una realización, la retención hace
5 que el complejo sea adecuado para su uso en el método divulgado en el presente documento, es decir, adecuado para su uso en al menos una exploración funcional.

En una realización, la interacción de unión es reversible.

10 Especificidad, cuando se usa en relación con X e Y, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a casos donde los compañeros de unión X e Y en la interacción solo se reconocen entre sí o tienen una afinidad por el otro significativamente mayor en comparación con no
15 compañeros, por ejemplo, una afinidad al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor.

En una realización, la interacción de unión entre X e Y tiene una baja constante de disociación.

Los ejemplos de una baja constante de disociación
20 incluyen $1-9 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ o menor, por ejemplo, $1-9 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$, $1-9 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$, $1-9 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, $1-9 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ o $1-9 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$. Las constantes de disociación particularmente adecuadas incluyen $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ o menor, por ejemplo, $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ o $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$.

25 Sin pretender limitarse a teoría alguna, se considera que la baja constante de disociación (también citada como velocidad de disociación) permite que las moléculas sean lo suficientemente estables como para que el complejo de proteína biespecífica sea útil, en particular, en ensayos
30 de exploración funcional.

En una realización, la afinidad de X e Y entre sí es de 5 nM o más fuerte, por ejemplo, 4nM, 3nM, 2nM, 1nM o más fuerte.

En una realización, la afinidad de X e Y entre sí es
5 de 900pM o más fuerte, tal como de 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 o 50pM o más fuerte.

En otra realización, la afinidad de X e Y entre sí es de 10 pM o más fuerte, por ejemplo, de 9, 8, 7, 6 o 5 pM.

La afinidad es un valor calculado a partir de la
10 velocidad de asociación y disociación de una interacción. El término "afinidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de
15 unión (por ejemplo, un péptido). La afinidad de una molécula por su compañero de unión puede representarse generalmente por la constante de disociación en equilibrio (K_D). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en
20 el presente documento, tales como los métodos de resonancia de plasmón superficial, en particular, BIAcore.

En una realización, se ensayan en paralelo o de manera esencialmente simultánea múltiples complejos de proteína biespecífica de acuerdo con la presente divulgación.

25 De manera simultánea, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a los casos donde las muestras/moléculas/complejos se analizan en el mismo análisis, por ejemplo, en el mismo "ciclo".

En una realización, de manera simultánea se refiere al
30 análisis concomitante donde se analiza la señal de salida por el instrumento esencialmente al mismo tiempo. Esta

señal puede necesitar su descodificación para interpretar los resultados obtenidos.

Ventajosamente, la prueba de múltiples complejos de proteína biespecífica permite una exploración más eficaz de un gran número de complejos de proteína biespecífica y la identificación de relaciones nuevas e interesantes. Las regiones variables claramente diferentes a los antígenos diana de interés, CD22 y CD79, pueden proporcionar acceso a matices sutiles en la función biológica.

En una realización, se prueban los múltiples complejos de proteína biespecífica usando un múltiplex, como se ha definido anteriormente y sometiendo al mismo a uno o más ensayos funcionales.

La expresión "función biológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una actividad que es natural para el propósito de la entidad biológica que se está probando, por ejemplo, una actividad natural de una célula, proteína o similar. De manera ideal, puede probarse la presencia de la función usando un ensayo funcional *in vitro*, incluyendo ensayos que utilizan células vivas de mamífero. La función natural, tal como se emplea en el presente documento, incluye una función aberrante, tal como funciones asociadas con los cánceres.

En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la presente divulgación tiene una función novedosa o sinérgica.

La expresión "función sinérgica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una actividad biológica que no se observa o que es mayor que la observada cuando no se emplean juntas las proteínas primera y segunda de un complejo de proteína biespecífico de la presente divulgación,

por ejemplo, una actividad que solo se observa en una forma biespecífica. Por lo tanto, "sinérgico" incluye una función biológica novedosa.

5 Función biológica novedosa, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una función que no es evidente o que está ausente hasta que se unen las dos o más entidades sinérgicas [proteína A y proteína B] (en una forma biespecífica u otra) o una función no identificada previamente.

10 Mayor, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un aumento en la actividad, incluyendo un aumento de cero, es decir, cierta actividad en la forma biespecífica, donde el componente o los componentes biespecíficos individuales no en forma de complejo no
15 tiene/tienen actividad en el ensayo funcional relevante, también citado en el presente documento como nueva actividad o función biológica novedosa. Mayor, tal como se emplea en el presente documento, también incluye una función más que aditiva en la forma biespecífica en un
20 ensayo funcional relevante en comparación con los componentes biespecíficos individuales no en forma de complejo o los dominios de unión bivalentes, por ejemplo, un aumento del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300% o más en una actividad relevante.

25 En una realización, la función sinérgica novedosa es una mayor actividad inhibidora.

 En una realización, la molécula de anticuerpo multiespecífica de la presente invención tiene una mayor función inhibidora que la suma de la actividad de un
30 dominio de unión bivalente a CD22 y la de un dominio de unión bivalente a CD79a, proporcionada sola o en mezcla.

En una realización, al menos uno del primer compañero de unión, X, y el segundo compañero de unión, Y, del par de unión se selecciona independientemente entre un péptido y una proteína; por ejemplo, el primer compañero de unión o
5 el segundo compañero de unión es un péptido.

Los péptidos adecuados incluyen el grupo que comprende GCN4, Fos/Jun (Fos humano y murino tienen los números de Uniprot P01100 y P01101, respectivamente y jun humano y murino tienen los números de Uniprot P05412 y P05627,
10 respectivamente), hemaglutinina (HA) de gripe humana, polihistidina (His), proteína fluorescente verde (GFP) y FLAG. También se contemplan como adecuados para su uso en la presente divulgación otros péptidos y los péptidos particularmente adecuados son las etiquetas de afinidad
15 para la purificación de proteínas, ya que dichos péptidos tienen tendencia a unirse con alta afinidad a sus respectivos compañeros de unión.

El término "péptido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero de aminoácidos corto
20 unidos mediante enlaces peptídicos, en donde el péptido contiene del orden de 2 a 100 aminoácidos, por ejemplo, de 5 a 99, tal como de 6 a 98, de 7 a 97 o de 8 a 96. En una realización, un péptido empleado en la presente divulgación es una secuencia de aminoácidos de 50 restos de aminoácido
25 o menos, por ejemplo, de 40, 30, 10 o menos. Los péptidos usados en la presente divulgación tienen una longitud suficiente para cumplir con su propósito, por ejemplo, en caso de que el péptido sea un enlazador, tiene que tener una longitud adecuada que permita que el fragmento al que
30 se une efectúe su función biológica; como alternativa, en caso de que el péptido sea un compañero de unión, tiene que

ser capaz de unirse específicamente a otra entidad, tal como un anticuerpo.

En una realización, el otro compañero de unión del par de unión (el primero o el segundo compañero de unión alternativo) es una proteína.

Proteína, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos de 100 aminoácidos o más. En una realización, una "proteína", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos con una estructura secundaria o terciaria.

En una realización, la primera proteína, A y/o la segunda proteína, B, del complejo de proteína biespecífica, es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Dicho complejo de proteína biespecífica puede citarse como un complejo de anticuerpo biespecífico.

En una realización, cada anticuerpo o fragmento empleado en el complejo de anticuerpo biespecífico de la divulgación comprende un sitio de unión.

El anticuerpo de longitud completa o el fragmento de anticuerpo empleado en las proteínas de fusión (A-X o B-Y) puede ser monoespecífica, multivalente o biespecífico.

Ventajosamente, el uso de dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo biespecíficos permite que las moléculas de la presente divulgación, tales como el complejo de anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento, sean potencialmente específicas para hasta 4 antígenos diferentes (es decir, el complejo puede ser tetraespecífico). Esto permite investigar los efectos de tipo avidez.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la primera proteína de fusión A-X, es un anticuerpo o
5 fragmento de anticuerpo monoespecífico, por ejemplo, un Fab, Fab', scFv o similar y en particular, es específico para CD22.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente
10 divulgación o los componentes de la misma, tales como la segunda proteína de fusión B-Y, es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoespecífico, por ejemplo, un Fab, Fab', scFv o similar y en particular, es específico para CD79a y/o CD79b.

15 En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la segunda proteína de fusión B-Y, es multivalente, es decir, tiene dos o más dominios de unión.

20 En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la primera proteína de fusión A-X, es monovalente y el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las
25 moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la segunda proteína de fusión, B-X, es monovalente.

Por lo tanto, en una realización, los dominios de unión de las moléculas multiespecíficas de la presente
30 divulgación son monovalentes.

Por lo tanto, en una realización, los dominios de unión de las moléculas multiespecíficas de la presente divulgación son monovalentes y monoespecíficas.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la primera proteína de fusión A-X, es monovalente y el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la segunda proteína de fusión, B-Y, es multivalente.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la primera proteína de fusión A-X, es multivalente y el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la segunda proteína de fusión, B-Y, es monovalente.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la primera proteína de fusión A-X, es multivalente y el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo empleado en las moléculas de la presente divulgación o los componentes de la misma, tales como la segunda proteína de fusión, B-Y, es multivalente.

En una realización, un primer anticuerpo, un segundo anticuerpo o tanto el primer anticuerpo como el segundo de las moléculas de la presente invención o los componentes de la misma, tal como un complejo de anticuerpo biespecífico,

puede encontrarse en un formato de IgG, por ejemplo, puede proporcionarse un anticuerpo anti-CD22 y/o anti-CD79 en un formato de IgG.

En una realización, se selecciona un fragmento de anticuerpo entre el grupo que consiste en: un fragmento de unión a antígeno (Fab), un fragmento variable monocatenario (scFv) y un anticuerpo de un solo dominio (sdAb), tal como un scFv, que se emplea en la primera proteína de fusión (A-X) o la segunda (B-Y). Ventajosamente, el pequeño tamaño de un scFv puede facilitar el plegamiento correcto de los complejos de anticuerpo biespecífico.

En una realización, el primer anticuerpo/fragmento (A), el segundo (B) o tanto el primer como el segundo anticuerpo/fragmento del complejo de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación puede ser un Fab.

En una realización, el primer anticuerpo/fragmento, el segundo o tanto el primer como el segundo anticuerpo/fragmento del complejo de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación es/son una V_{HH} .

"Proteína de fusión", tal como se emplea en el contexto de un complejo biespecífico de la presente divulgación, se refiere a una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a un compañero de unión.

Por conveniencia, los complejos de proteína biespecífica de la presente divulgación se citan en el presente documento como A-X;Y-B. Sin embargo, esta nomenclatura no pretende limitar el modo en que se diseñan las proteínas de fusión A-X y B-Y, ya que los presentes experimentos indican que pueden invertirse los compañeros de unión X e Y, es decir, A-Y y B-X, sin tener un impacto

negativo en el método. Por lo tanto, A y B y X e Y son etiquetas nominales citadas para ayudar a explicar la presente tecnología.

5 "Unido", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a conectado o unido directa o indirectamente a través de un enlazador, tal como un enlazador peptídico, cuyos ejemplos se describen más adelante. Conectado directamente incluye fusionado (por ejemplo, un enlace peptídico) o conjugado químicamente.

10 "Compañero de unión", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un componente que es parte de un par de unión.

En una realización, la afinidad del compañero de unión es alta, 5nM o más fuerte, tal como 900, 800, 700, 600, 500,
15 400, 300pM o más fuerte.

"Par de unión", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a dos compañeros de unión que se unen específicamente entre sí. Los ejemplos de un par de unión incluyen un péptido y un anticuerpo o fragmento de unión
20 específico para el mismo o una enzima y un ligando o una enzima y un inhibidor de esa enzima.

En una realización, el primer compañero de unión (X) se selecciona entre el grupo que comprende: un anticuerpo de longitud completa, un Fab, un Fab', un scFv, un péptido
25 y un sdAb, en donde los ejemplos de un sdAb incluyen VH o VL o V_HH.

En una realización, el segundo compañero (Y) se selecciona entre el grupo que comprende: un anticuerpo de longitud completa, un Fab, un Fab', un scFv, un péptido y
30 un sdAb, en donde los ejemplos de un sdAb incluyen VH o VL o V_HH.

En una realización, en los casos donde A es un anticuerpo o un fragmento del mismo, el primer compañero de unión (X) está unido al extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera del primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo, el primer compañero de unión está unido al extremo C-terminal de la cadena pesada del primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En otra realización, en los casos donde B es un anticuerpo o un fragmento del mismo, el segundo compañero de unión (Y) está unido al extremo C-terminal de la cadena pesada o ligera del segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo, el segundo compañero de unión está unido al extremo C-terminal de la cadena pesada del segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En una realización, X está unido al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento (proteína A) e Y está unido al extremo C-terminal del anticuerpo o fragmento (proteína B).

En una realización, X está unido a través de un enlazador (tal como ASGGGG o ASGGGGSG) al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento (proteína A) e Y está unido a través de un enlazador (tal como ASGGGG o ASGGGGSG) al extremo C-terminal del anticuerpo o fragmento (proteína B).

En una realización, el primer o el segundo compañero de unión (X o Y) es un péptido.

Los ejemplos de un par de unión adecuado pueden incluir GCN4 (SEQ ID NO: 247) o una variante del mismo y 52SR4 (SEQ ID NO: 249) o una variante del mismo, que es un scFv específico para GCN4.

En una realización, el primer compañero de unión (denominado X) es GCN4 (por ejemplo, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 247) o una variante del mismo (por ejemplo, sin la etiqueta His) y el segundo compañero de unión (denominado Y) es un scFv específico para GCN4 (por ejemplo, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 249) o una variante del mismo.

En una realización, el primer compañero de unión (denominado X) es un scFv específico para GCN4 (por ejemplo, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 249) o una variante del mismo y el segundo compañero de unión (denominado Y) es GCN4 (por ejemplo, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 247) o una variante del mismo.

Las variantes de GCN4 incluyen una secuencia de aminoácidos con al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% o 98% o 99% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 247. Las variantes de GCN4 también incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad respecto de una secuencia codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 248 o una secuencia de nucleótidos que hibrida con la SEQ ID NO: 145 en condiciones rigurosas.

Un scFv adecuado específico para GCN4 es 52SR4 (SEQ ID NO: 146) o una variante del mismo. Las variantes de 52SR4 incluyen una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% u 85% o 90% o 95%, o 98% o 99% de identidad respecto de la SEQ ID NO: 250. Las variantes de 52SR4 también incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, u 85% o 90% o 95% o 98% o 99% de identidad respecto de una secuencia codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ

ID NO: 146 o una secuencia de nucleótidos que hibrida con la SEQ ID NO: 248 en condiciones rigurosas.

Los presentes inventores han descubierto que el anticuerpo monocatenario 52SR4 y el péptido GCN4 son un par
5 de unión adecuado para su uso en los complejos de proteína biespecífica de la presente divulgación.

Como alternativa, puede emplearse como X e Y cualquier anticuerpo/fragmento y antígeno (tal como un péptido) adecuado.

10 En una realización, el primer compañero de unión (X) y el segundo compañero de unión (Y) son una proteína.

En una realización, el primer compañero de unión (X) es una enzima o un fragmento activo de la misma y el segundo compañero de unión (Y) es un ligando o viceversa.

15 En una realización, el primer compañero de unión (X) es una enzima o un fragmento activo de la misma y el segundo compañero de unión (Y) es un inhibidor de esa enzima o viceversa.

"Fragmento activo", tal como se emplea en el presente
20 documento, se refiere a un fragmento de aminoácidos que es menor que la secuencia de aminoácidos completa para la entidad y conserva esencialmente la misma actividad biológica o una actividad biológica, por ejemplo, más de un 50% de la actividad, tal como un 60%, 70%, 80%, 85%, 90%,
25 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

En otra realización, el primer compañero de unión X es glutatión (GSH) y el segundo compañero de unión Y es glutatión-S-transferasa (GST) o viceversa.

En otra realización, X es Fos e Y es Jun o viceversa.

30 En otra realización, X es His e Y es anti-His o viceversa.

En otra realización, el par de unión es péptido de unión a calmodulina e Y es calmodulina o viceversa.

En otra realización, X es proteína de unión a maltosa e Y es una proteína de unión anti-maltosa o un fragmento de la misma o viceversa.

También se contemplan para su uso en los compañeros de unión otras combinaciones de enzima-ligando. También son adecuadas las etiquetas de afinidad conocidas en la técnica para la purificación de proteínas ya que estas tienen tendencia a unirse con alta afinidad a sus compañeros de unión respectivos.

Los grados de identidad y similitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el programa informático BLAST™ disponible en el NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. y States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

En una realización, el primer o el segundo compañero de unión (X o Y) es una proteína o un péptido.

En una realización, las proteínas de fusión primera y segunda comprenden uno o más enlazadores peptídicos. Los

enlazadores pueden incorporarse en diversas ubicaciones en las proteínas de fusión. Por ejemplo, puede introducirse un enlazador entre un compañero de unión y la proteína unida al mismo.

5 En otra realización, el enlazador es un enlazador peptídico.

 La expresión "enlazador peptídico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido con secuencias de aminoácidos. Los expertos en la materia
10 conocen una serie de enlazadores peptídicos adecuados.

 En una realización, el enlazador peptídico puede ser de origen sintético, es decir, prepararse mediante técnicas de química sintética.

 En una realización, los compañeros de unión de los
15 complejos de proteína biespecífica están unidos a sus proteínas respectivas por medio de enlazadores peptídicos.

 En una realización, la proteína de fusión es una fusión traduccional, es decir, una proteína de fusión expresada en una célula hospedadora que comprende una
20 construcción genética a partir de la cual se expresa la proteína de fusión.

 En una realización, la proteína de fusión se prepara conjugando A a X o B a Y, opcionalmente por medio de un enlazador peptídico.

25 En una realización, el enlazador peptídico tiene 50 aminoácidos de longitud o menos, por ejemplo, 20 aminoácidos o menos.

 En general, será más eficaz expresar la proteína de fusión de manera recombinante y por lo tanto, puede ser
30 ventajoso un enlace peptídico directo o un enlazador peptídico que pueda expresarse por una célula hospedadora.

En una realización, los complejos formados no requieren etapas de purificación adicionales.

En una realización, los complejos formados requieren una etapa de purificación, por ejemplo, cromatografía en
5 columna.

En una realización, el método comprende además al menos una etapa de purificación, por ejemplo, después de la expresión de una proteína de fusión de acuerdo con la presente divulgación.

10 Un "ensayo funcional", tal como se usa en el presente documento, es un ensayo que puede usarse para determinar una o más propiedades o actividades deseadas de los complejos de proteína, complejos de anticuerpo o la mezcla de anticuerpos sometida a las condiciones de ensayo. Los
15 ensayos funcionales adecuados pueden ser ensayos de unión, ensayos de apoptosis, ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), ensayos de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), ensayos de inhibición del crecimiento o la proliferación celular (efecto citostático),
20 ensayos de eliminación de células (efecto citotóxico), ensayos de señalización celular, ensayos de producción de citocinas, producción de anticuerpos y cambio de isotipo y ensayos de diferenciación celular. En una realización, pueden emplearse ensayos *in vivo*, tales como modelos
25 animales, incluyendo modelos de tumor de ratón, modelos de enfermedades autoinmunitarias, modelos de roedor o primate infectados por virus o infectados por bacterias y similares, para probar las moléculas de la presente divulgación.

En el contexto de los complejos de anticuerpo
30 biespecíficos, puede compararse la eficacia de los complejos de anticuerpo biespecíficos de acuerdo con la

presente divulgación con anticuerpos individuales o mezclas de anticuerpos (o fragmentos) en dichos modelos mediante métodos conocidos generalmente por un experto habitual en la materia.

5 Pueden repetirse los ensayos funcionales un número de veces según sea necesario con o sin diferentes muestras de un complejo de anticuerpo biespecífico particular para mejorar la fiabilidad de los resultados. Pueden emplearse diversas pruebas estadísticas conocidas por el experto en
10 la materia para identificar resultados estadísticamente significativos y de este modo, identificar complejos de anticuerpo multiespecíficos con funciones biológicas y en particular, para identificar pares de regiones variables óptimos para su uso en la molécula multiespecífica de la
15 presente invención.

COMPOSICIONES Y USOS MÉDICOS

 En un aspecto, se proporciona una molécula de acuerdo con la presente divulgación o un componente, tal como una proteína de fusión, un complejo de proteína biespecífico
20 anclado de manera heterodimérica, una composición que comprende una molécula de la invención, incluyendo una proteína de fusión o dicho complejo de proteína biespecífico, un múltiplex, matriz o biblioteca, tal como se definen en el presente documento.

25 En una realización, las moléculas de la presente divulgación, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento, una molécula multiespecífica y un complejo de proteína biespecífico son adecuados para aplicaciones terapéuticas y pueden proporcionar nuevas
30 terapias para tratar enfermedades. Por lo tanto, en un aspecto adicional, se proporciona una molécula de

anticuerpo de la presente divulgación, por ejemplo, un complejo de proteína biespecífico tal como se ha descrito anteriormente, para su uso en terapia. Las moléculas de la presente divulgación, incluyendo los complejos de proteína
5 biespecíficos descritos en el presente documento, son adecuados para tratar una serie de enfermedades, tales como el cáncer.

Las moléculas de la presente divulgación, incluyendo las moléculas biespecíficas y complejos de proteína
10 biespecíficos descritos en el presente documento, también son particularmente idóneos para inhibir la función de los linfocitos B para controlar reacciones inmunitarias y autoinmunitarias en diversas enfermedades autoinmunitarias.

Por lo tanto, la presente divulgación se extiende a un
15 método para tratar una enfermedad en un paciente, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de la presente divulgación, por ejemplo, una molécula multiespecífica o un complejo de proteína biespecífico de la presente
20 divulgación.

En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una o más moléculas de la presente divulgación, por ejemplo, una molécula multiespecífica de la presente divulgación.

25 Pueden incluirse diversos componentes diferentes en la composición, incluyendo vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, la composición puede comprender moléculas adicionales capaces de alterar las características de la población de moléculas
30 multiespecíficas de la invención, de este modo, por ejemplo, reduciendo, estabilizando, retrasando, modulando y/o

activando la función de los anticuerpos. La composición puede encontrarse en forma sólida o líquida y puede encontrarse, entre otras, en forma de un polvo, un comprimido, una solución o un aerosol.

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

PATOLOGÍAS

15 La patología o trastorno puede seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infecciones, artritis, tal como artritis reumatoide, asma, tal como asma grave, enfermedad
20 pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal,
25 peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios mediados por inmunidad del sistema nervioso central y periférico, tales como la esclerosis
30 múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y síndrome de Guillain-Barre, dermatitis atópica, hepatitis

autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (quirúrgico), enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de trasplantes, enfermedad cardíaca, incluyendo enfermedades isquémicas, tales como infarto de miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, artrosis, periodontitis, hipoclorhidria y cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovarios, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello de útero y cáncer de tiroides y las formas metastásicas de los mismos.

En un ejemplo, el trastorno es un cáncer, por ejemplo, leucemia, incluyendo leucemia linfocítica, tal como leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica; o leucemia mielógena, tal como leucemia mielógena aguda o leucemia mielógena crónica.

En una realización, la enfermedad autoinmunitaria incluye: encefalomiелitis aguda diseminada (ADEM), leucoencefalitis hemorragia necrotizante aguda, enfermedad de Addison, insuficiencia suprarrenal, hipocortisolismo, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, espondiloartritis, enfermedad de Strumpell-Marie, nefritis anti-GBM/anti-TBM, síndrome antifosfolípidos (APS),

angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, disautonomía autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), síndrome de Canale-Smith, miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria (AIP), síndromes poliglandulares autoinmunitarios (tipos I, II y III),
10 retinopatía autoinmunitaria (AR), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, neuropatías axonales/neuronales, enfermedad de Balo, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman,
15 enfermedad celiaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), osteomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatrizal/penfigoide mucoso benigno (CP), enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del
20 intestino, colitis, enteritis, ileítis, síndrome de Cogan, enfermedad de las aglutininas frías, taponamiento cardíaco congénito, miocarditis de Coxackie, enfermedad de Crest, crioglobulinemia, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, enfermedad de Duhring, dermatomiositis,
25 diabetes de tipo I, lupus eritematoso discoide (DLE), síndrome de Dressler, endometriosis, epidermólisis bullosa (EB) y EB adquirida (EBA), gastroenteritis eosinofílica, esofagitis, fascitis eosinofílica, síndrome de Schulman, eritema nodoso, encefalomielitis alérgica experimental,
30 síndrome de Evans, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), miocarditis de

células gigantes, glomerulonefritis (no proliferativa: glomeruloesclerosis segmentaria focal y glomerulonefritis membranosa; proliferativa: nefropatía por IgA), síndrome de Goodpasture, granulomatosis con poliangitis (GPA)

5 (anteriormente denominada granulomatosis de Wegener), enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda, neuropatía axonal sensorial aguda, neuropatía panautónoma aguda, encefalitis del tronco cerebral de Bickerstaff,

10 encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA (IGAN), síndrome de Berger, glomerulonefritis

15 sinfaringítica, pénfigo por IgA, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, infertilidad regulada por inmunidad, miositis por cuerpos de inclusión, diabetes mellitus insulín dependiente, cistitis intersticial, síndrome de Isaac, neuromiotonía, artritis juvenil, miositis juvenil,

20 síndrome de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis lignosa, dermatosis por IgA lineales (LAD), penfigoide, lupus (SLE), enfermedad de Lyme, enfermedad de Meniere, poliangitis microscópica (MPA), enfermedad del

25 tejido conectivo mixto (MCTD), gammapatía monoclonal, úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Haberman, esclerosis múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (de Devic), neuromiotonía, síndrome de Isaac (adquirido, paraneoplásico, hereditario), neutropenia,

30 penfigoide cicatrizal ocular, neuritis óptica, ooforitis, síndrome opsoclono-mioclono, orquitis, reumatismo

palindrómico, pandas (trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos asociados con estreptococos), síndrome multiorgánico autoinmunitario paraneoplásico (PAMS), degeneración cerebelar paraneoplásica, pénfigo paraneoplásico (PNP), hemoglobinuria nocturna paroxisómica (PNH), síndrome de Parry-Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, pars planitis (uveítis periférica), penfigoide gestacional (PG), pénfigo vulgar (PV), pénfigo foliáceo (PF), neuropatía periférica, encefalitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de Poems, poliarteritis nodosa (PAN), polimialgia reumática, polimiositis, síndrome posterior al infarto de miocardio, síndrome posterior a pericardiotomía, dermatitis por progesterona, cirrosis biliar primaria, síndrome de Hanot, colangitis esclerosante primaria (PSC), colangitis esclerosante, psoriasis, artritis psoriásica, polidermia gangrenosa, aplasia pura de glóbulos rojos, encefalitis de Rasmussen, encefalitis focal crónica (CFE), fenómeno de Raynaud, artritis reactiva, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, síndrome de las piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumática, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, autoinmunidad espermática y testicular, síndrome de la persona/el hombre rígido, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, oftalmia simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, tromboangitis obliterante, enfermedad de Buerger, púrpura trombocitopénica (TTP), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversal, colitis ulcerosa, enfermedad del tejido conectivo no diferenciado (UCTD), uveítis, polimialgia

reumática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, enfermedad de Buerger, vasculitis cutánea, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, síndrome de Behçet, síndrome de Churg-Strauss, vasculitis cutánea, púrpura de Henoch-Schönlein, poliangitis microscópica, granulomatosis de Wegener, vasculitis del golfista, dermatosis vesiculobullosa, vitíligo, granulomatosis de Wegener (actualmente denominada granulomatosis con poliangitis (GPA)).

En una realización, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre el grupo que comprende o consiste en: vasculitis por ANCA, nefropatía por IgA (de Berger), pénfigo vulgar/penfigoide bulloso, ITP, cirrosis biliar primaria, tiroiditis autoinmunitaria (enfermedad de Graves), enfermedad de Hashimoto, nefritis lúpica, glomerulonefritis membranosa (o nefropatía membranosa), APS, miastenia grave, neuromielitis óptica, síndrome de Sjögren primario, neutropenia autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, dermatomiositis, uveítis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, enfermedad de Behçet, IPF, esclerosis sistémica, fibrosis hepática, hepatitis autoinmunitaria, colangitis esclerosante primaria, vitíligo, síndrome de Goodpasture, proteinosis alveolar pulmonar, urticaria autoinmunitaria crónica, psoriasis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondiloartritis axial, trasplante (incluyendo GvHD), asma, EPOC, arteritis de células gigantes, citopenias autoinmunitarias refractarias, síndrome de Evans (anemia hemolítica autoinmunitaria), diabetes de tipo I, sarcoidosis, polimiositis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, macroglobulinemia de Waldenstrom, glomeruloesclerosis

segmentaria focal, enfermedad de Lyme crónica (borreliosis de Lyme), liquen plano, síndrome de la persona rígida, cardiomiopatía dilatada, ooforitis autoinmunitaria (linfocítica), epidermólisis bullosa adquirida, gastritis
5 atrófica autoinmunitaria, anemia perniciosa, dermatitis atópica, aterosclerosis, esclerosis múltiple, encefalitis de Rasmussen, síndrome de Guillain-Barré, neuromiotonía adquirida y accidente cerebrovascular.

En un ejemplo, el trastorno es un cáncer, por ejemplo,
10 leucemia, por ejemplo, leucemia linfocítica, tal como leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica; o leucemia mielógena, tal como leucemia mielógena aguda o leucemia mielógena crónica; o linfoma, tal como linfoma difuso de linfocitos B grandes o linfoma de Hodgkin o no
15 Hodgkin.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de la presente divulgación, tal como una molécula multiespecífica descrita en el presente documento en
20 combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de una molécula de la presente divulgación, tal como una molécula multiespecífica como se ha descrito en el presente documento para su uso en
25 tratamiento y en la fabricación de un medicamento.

Normalmente, la composición se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede
30 comprender además un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

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

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un vehículo, solución o aditivo de formulación
10 farmacéuticamente aceptable para potenciar las características deseadas de las composiciones de la presente divulgación. Los excipientes son de sobra conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón
15 bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación
20 se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Estos pueden incluir la producción y esterilización por filtrado de la solución disolvente tamponada usada para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la
25 solución disolvente tamponada estéril y la dispersión de la formulación en receptáculos estériles mediante métodos que resultan familiares para los expertos habituales en la materia.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe
30 inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y

no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas de gran tamaño que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas.

Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Dichos vehículos hacen posible que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para ingestión por parte del paciente.

Las moléculas de la divulgación, tales como una molécula multiespecífica descrita en el presente documento, puede suministrarse dispersa en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una disolución fisiológica adecuada, por ejemplo disolución salina fisiológica, un disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, de 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, de 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, de 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0.45 mg a 0.55 mg de citrato de sodio por cada 1 ml de agua para

conseguir un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Tal como se ha mencionado anteriormente, puede efectuarse una suspensión, por ejemplo, a partir de anticuerpos liofilizados.

5 Se puede consultar una exposición exhaustiva de portadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

10 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad o afección diana o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, puede estimarse la cantidad
15 terapéuticamente eficaz inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos con animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración adecuados. Dicha
20 información puede usarse posteriormente para determinar las dosis y las vías de administración útiles en seres humanos.

25 La cantidad terapéuticamente eficaz exacta para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la patología, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante
30 experimentación rutinaria y está dentro del criterio del médico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo, de 0.1 mg/kg a

20 mg/kg. Como alternativa, la dosis será de 1 a 500mg al día, tal como de 10 a 100, 200, 300 o 400mg al día. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen
5 una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse combinadas (por ejemplo, de forma simultánea, secuencial o por separado)
10 con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis que se administra de la molécula multiespecífica de la presente divulgación depende de la naturaleza de la afección que se vaya a tratar, el alcance de la inflamación presente y de si la molécula de
15 anticuerpo se está usando de manera profiláctica o para tratar una afección existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula multiespecífica y de la duración de su efecto. Si la molécula multiespecífica tiene una semivida corta
20 (por ejemplo, de 2 a 10 horas), puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Como alternativa, en caso de que la molécula multiespecífica tenga una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días), puede ser necesario administrar solo una dosis al día, una vez a la semana o
25 incluso una vez cada 1 o 2 meses.

En la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico de la molécula multiespecífica, por ejemplo, en caso de que el pH de la formulación sea 7, puede ser adecuado un pI de 8-9.
30 Sin pretender limitarse a teoría alguna, se cree que esto puede proporcionar, en última instancia, una formulación

final con estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante cualquier número de vías, incluyendo, pero sin limitación, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hipoaerosoles para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención.

El suministro directo de las composiciones se llevará a cabo generalmente mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o se suministrarán al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en un tejido específico de interés. El tratamiento de dosificación puede ser una pauta de una sola dosis o una pauta de múltiples dosis.

En los casos en los que el producto esté destinado a inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula multiespecífica puede encontrarse en forma seca para su reconstitución antes de su uso con un líquido estéril adecuado. En caso de que la composición vaya a administrarse por una ruta que use el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan al anticuerpo frente a la degradación pero que libere al complejo de

proteína biespecífico una vez que haya sido absorbido del tracto gastrointestinal.

Una formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de
5 dosis unitarias individuales (por ejemplo, viales o recipientes de plástico cerrados herméticamente) envasadas en envoltorios de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo 2 ml, de disolvente/tampón de disolución.

10 El término "variante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido o proteína que contiene al menos una alteración de la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos en comparación con la secuencia de aminoácidos o nucleótidos del péptido o la proteína de tipo
15 silvestre correspondiente. Una variante puede comprender al menos un 80% u 85% o 90% o 95% o 98% o 99% de identidad de secuencia respecto del péptido o proteína de tipo silvestre correspondiente. Sin embargo, es posible que una variante comprenda una identidad de secuencia menor del 80%, siempre
20 que la variante muestre una función sustancialmente similar a su péptido o proteína de tipo silvestre correspondiente.

En una realización, la construcción de la presente divulgación es al menos triespecífica. En esta situación, la especificidad adicional puede dirigirse a cualquier
25 antígeno de interés, por ejemplo, antígenos que prolongan la semivida, tales como albúmina o receptor neonatal de Fc (FcRn); antígenos para función efectora, tales como receptores de Fc activantes o inhibidores o moléculas coestimuladoras; antígenos de direccionamiento tisular o
30 celular; o antígenos para ayudar en la transferencia por la

barrera hematoencefálica (BBB), tales como el receptor de transferrina o LRP1.

La divulgación también se extiende a composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden
5 dichos nuevos formatos con la especificidad de antígeno particular.

En un aspecto adicional, la divulgación incluye el uso de los formatos y las composiciones en tratamiento.

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

La molécula de anticuerpo o la molécula multiespecífica puede ser el único principio activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar
15 acompañada por otros principios activos, incluyendo otros ingredientes de anticuerpos o ingredientes que no sean anticuerpos, tales como esteroides u otras moléculas farmacológicas.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de manera adecuada una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad
25 terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad o afección diana o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier
30 anticuerpo, puede estimarse la cantidad terapéuticamente eficaz inicialmente en ensayos de cultivo celular o en

modelos con animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración adecuados. Dicha información puede
5 usarse posteriormente para determinar las dosis y las vías de administración útiles en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz exacta para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la patología, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del
10 sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante experimentación rutinaria y está dentro del criterio del
15 médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0.01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo de 0.1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como 100 mg/Kg.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de manera conveniente en formas de dosificación unitarias que
20 contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse combinadas (por ejemplo, de forma simultánea, secuencial o por separado)
25 con otros agentes, fármacos u hormonas.

Agentes, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una entidad que cuando se administra, tiene un efecto fisiológico.

Fármaco, tal como se emplea en el presente documento,
30 se refiere a una entidad química que a una dosis terapéutica, tiene un efecto fisiológico adecuado.

En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente divulgación se emplean con una terapia inmunosupresora, tal como un esteroide, concretamente prednisona.

5 En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente divulgación se emplean con Rituximab u otras terapias para linfocitos B.

10 En una realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la presente divulgación se emplean con cualquier agente modulador de linfocitos B o linfocitos T o inmunomodulador. Los ejemplos incluyen metotrexato, micofenolato y azatioprina.

15 La dosis a la cual se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está usando de manera profiláctica o para tratar una afección existente.

20 La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. En caso de que la molécula de anticuerpo tenga una semivida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas), podría ser necesario administrar una o más dosis al día. Como alternativa, en caso de que la molécula de anticuerpo tenga una semivida
25 larga (por ejemplo, de 2 a 15 días) y/o un perfil farmacodinámico (PD) de larga duración, puede ser necesario administrar solo una dosis al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

30 En una realización, la dosis se suministra bisemanalmente, es decir, dos veces al mes.

En una realización, se espacian las dosis para permitir que desaparezcan las respuestas anti-fármaco (en este caso, anti-anticuerpo) antes de la administración de una dosis adicional.

5 Se pretende que la semivida, tal como se emplea en el presente documento, se refiera a la duración de la molécula en circulación, por ejemplo, en suero/plasma.

 Farmacodinámica, tal como se usa en el presente documento, se refiere al perfil y en particular la duración
10 de la acción biológica de la molécula de acuerdo con la presente divulgación.

 El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y
15 no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas de gran tamaño que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y
20 partículas víricas inactivas.

 Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y
25 benzoatos.

 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias
30 auxiliares en estas composiciones, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras del

pH. Dichos vehículos hacen posible que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para su ingesta por parte del
5 paciente.

Las formas de administración adecuadas incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. En los casos en los que el producto esté
10 destinado a inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo
15 puede estar en forma seca, para reconstituirla antes de su uso con un líquido estéril adecuado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en
20 una o más realizaciones, las composiciones están adaptadas para la administración a sujetos humanos.

De manera adecuada en las formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o
25 fragmento, por ejemplo, en caso de que el pI de la proteína se encuentre en el intervalo de 8-9 o superior, puede ser adecuado un pH de formulación de 7. Sin pretender limitarse a teoría alguna, se cree que esto puede proporcionar, en última instancia, una formulación final con estabilidad
30 mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

En un ejemplo, la formulación farmacéutica a un pH en el intervalo de 4.0 a 7.0 comprende: de 1 a 200mg/mL de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación, de 1 a 100mM de un tampón, del 0.001 al 1% de un tensioactivo, a) de 10 a 500mM de un estabilizante, b) de 10 a 500mM de un estabilizante y de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad o c) de 5 a 500 mM de un agente de tonicidad.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante cualquier número de vías, incluyendo, pero sin limitación, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hipoaerosoles para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Habitualmente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como composiciones inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en portadores líquidos antes de la inyección.

El suministro directo de las composiciones se llevará a cabo generalmente mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o se suministrarán al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse a una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser una pauta de una sola dosis o una pauta de múltiples dosis.

Se apreciará que el principio activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, esta será

sensible a la degradación en el aparato digestivo. De este modo, si la composición va a administrarse mediante una vía que use el aparato digestivo, la composición deberá contener agentes que protejan al anticuerpo contra la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez que
5 degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez que haya sido absorbido del aparato digestivo.

Se puede consultar una exposición exhaustiva de portadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J.
10 1991).

En una realización, se proporciona la formulación en forma de una formulación para administración tópica, incluyendo inhalación.

Los preparados inhalables adecuados incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propelentes o soluciones inhalables exentas de gases propelentes. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden estar constituidos únicamente por las sustancias activas
15 inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propelentes o soluciones inhalables exentas de gases propelentes. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden estar constituidos únicamente por las sustancias activas mencionadas anteriormente o por una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.
20 mencionadas anteriormente o por una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Convenientemente, se usan mono o disacáridos, estando el
25 ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Convenientemente, se usan mono o disacáridos, estando el uso de lactosa o glucosa particular pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.
30 uso de lactosa o glucosa particular pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

Las partículas para su deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micrómetros, tal como de 1-9 micrómetros, por ejemplo, de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del principio activo (tal como el anticuerpo o fragmento) tiene una importancia primordial.

Los gases propulsores que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables se conocen en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos, tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos, tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente se pueden utilizar solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propulsores particularmente adecuados son los derivados halogenados de alcanos seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, son particularmente adecuados TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano), y mezclas de los mismos.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propulsores también pueden contener otros ingredientes, tales como codisolventes, estabilizantes, agentes activos de superficie (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes se conocen en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen un gas propulsor de acuerdo con la invención pueden contener hasta un 5% en peso de la sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de un 0.002 a un 5% en peso, de un 0.01 a un 3% en peso, de un

0.015 a un 2% en peso, de un 0.1 a un 2% en peso, de un 0.5 a un 2% en peso o de un 0.5 a un 1% en peso del principio activo.

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

El anticuerpo o la molécula multiespecífica de la invención puede suministrarse dispersa en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica adecuada, por ejemplo, una solución salina u otro disolvente o una solución tamponada farmacológicamente aceptable. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, de 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, de 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, de 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0.45 mg a 0.55 mg de citrato de sodio por cada 1 ml de agua para conseguir un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, un anticuerpo liofilizado.

Las formulaciones terapéuticas en suspensión o solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son de sobra conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por

ejemplo, albúmina sérica), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se
5 proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración de la solución/disolvente tamponado utilizado para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo
10 en la solución/disolvente tamponado estéril y la dispensación de la formulación en receptáculos estériles mediante métodos con los cuales estarán familiarizados los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de dosis unitarias individuales (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) envasados en envoltorios de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 mL, de disolvente/solución
20 tampón.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden ser adecuados para su suministro por nebulización.

También se contempla que el anticuerpo de la presente invención pueda administrarse mediante el uso de terapia
25 génica. Para lograr esto, se introducen en un paciente secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes de ADN adecuados, de tal forma que las cadenas de anticuerpo se expresan a partir de las secuencias de ADN y
30 se ensamblan *in situ*.

En una realización, la molécula de la presente divulgación, tal como una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento, puede usarse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno o los antígenos de interés. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo de la divulgación puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno o antígenos, de manera directa o indirecta.

En una realización, se proporcionan moléculas de la presente divulgación, incluyendo proteínas de fusión, complejos de proteínas biespecíficos o composiciones que comprenden los mismos para su uso como reactivo de laboratorio.

La presente divulgación también se extiende a un kit que comprende una molécula de la presente divulgación o un componente de la misma. En una realización, el kit comprende:

a) una o más proteínas de fusión (A-X) que comprenden un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (A) específico para CD22 o CD79a y/o CD79b unido a un primer compañero de unión de un par de unión (X); y

b) una o más proteínas de fusión (B-Y) que comprenden un segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo (B) específico para CD22 o CD79a y/o CD79b unidos a un segundo compañero de unión del par de unión (Y), en donde la última es específica para el primer compañero de unión;

por ejemplo, en donde el primer compañero de unión (X) es un péptido o polipéptido y el segundo compañero de unión (Y) es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para el mismo;

en donde Y, el segundo compañero de unión, es específico para el primer compañero de unión X y el segundo compañero de unión es, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para el mismo; y la
5 interacción específica (tal como una interacción de unión) de los dos compañeros de unión forma un anclaje de heterodímero que une físicamente las dos proteínas de fusión de a) y b) para formar un complejo de proteína biespecífico; y

10 en donde al menos uno de A o B es específico para CD22 y el otro es específico para CD79a y/o CD79b y la(s) proteína(s) de fusión está(n) en forma de complejo o no en forma de complejo.

Ventajosamente, el kit puede comprender complejos de
15 proteína biespecíficos de la presente divulgación o puede comprender proteínas de fusión que se encuentran en forma de complejo o no en forma de complejo. En el primer caso, los complejos de proteína biespecíficos están listos para su uso "al sacarlos de la caja", lo que proporciona
20 comodidad y facilidad de uso, mientras que en el último caso, los complejos de proteína biespecíficos pueden ensamblarse según las necesidades del usuario usando combinaciones de diferentes proteínas de fusión.

En otra realización, el kit comprende además
25 instrucciones de uso.

En otra realización más, el kit comprende además uno o más reactivos para llevar a cabo uno o más ensayos funcionales.

En una realización, se proporcionan moléculas de la
30 presente divulgación, incluyendo proteínas de fusión, complejos de proteínas biespecíficos o composiciones que

comprenden los mismos para su uso como reactivo de laboratorio.

ASPECTOS ADICIONALES

En un aspecto adicional, se proporciona una secuencia
5 de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia de ADN que
codifica una construcción como se describe en el presente
documento que incluye una molécula multiespecífica o una
proteína de fusión como se ha definido anteriormente.

En una realización, se proporciona una secuencia de
10 nucleótidos, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica
una construcción como se ha descrito en el presente
documento que incluye una molécula multiespecífica o un
complejo de proteína biespecífico o un anticuerpo de
acuerdo con la presente divulgación.

15 La divulgación del presente documento también se
extiende a un vector que comprende una secuencia de
nucleótidos como se ha definido anteriormente.

El término "vector", tal como se usa en el presente
documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico
20 capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido.
Un ejemplo de un vector es un "plásmido", que es un bucle
de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse
segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un
vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN
25 adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son
capaces de replicarse de manera autónoma en una célula
hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores
bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano
y vectores episómicos de mamífero). Pueden integrarse otros
30 vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero)
en el genoma de una célula hospedadora, donde

posteriormente se replican junto con el genoma del hospedador. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable ya que la forma de vector más comúnmente
5 usada es un plásmido.

Los métodos generales mediante los que pueden construirse los vectores, métodos de transfección y métodos de cultivo se conocen bien por los expertos en la técnica. En este sentido, se hace referencia a "Current Protocols in
10 Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y al "Maniatis Manual" producido por Cold Spring Harbor Publishing.

La expresión "marcador de selección", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína cuya
15 expresión permite identificar células que se han transformado o transfectado con un vector que contiene el gen marcador. Se conocen en la técnica una gran variedad de marcadores de selección. Por ejemplo, el gen marcador de selección confiere típicamente resistencia a fármacos,
20 tales como G418, higromicina o metotrexato a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. El marcador de selección también puede ser un marcador identificable, tal como, por ejemplo, un marcador fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes
25 incluyen rodamina, FITC, TRITC, Alexa Fluor y diversos conjugados de los mismos.

También se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un
30 anticuerpo de la presente divulgación. Puede usarse cualquier sistema de célula hospedadora/vector para la

expresión de la secuencia de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente divulgación. Pueden usarse sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli* y otros sistemas microbianos o también pueden usarse sistemas de expresión en células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen CHO, células de mieloma o células de hibridoma.

La presente divulgación también proporciona un proceso para la producción de una molécula de acuerdo con la presente divulgación o un componente de la misma que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de la presente divulgación en condiciones adecuadas para dar lugar a la expresión de proteínas a partir del ADN que codifica la molécula de la presente divulgación y aislar la molécula.

Las moléculas de la presente divulgación que incluyen los complejos de proteína descritos en el presente documento pueden usarse en kits de diagnóstico/detección. Los kits pueden comprender, por ejemplo, complejos de anticuerpo biespecíficos que son específicos para dos antígenos, estando ambos presentes en el mismo tipo celular y en donde puede efectuarse un diagnóstico positivo únicamente si ambos antígenos se detectan con éxito. Al usar una molécula de la presente divulgación, tal como complejos de anticuerpo biespecíficos descritos en el presente documento en lugar de dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo separados en una forma no de complejo, puede mejorarse en gran medida la especificidad de la detección.

En una realización, las moléculas de la presente invención, tales como los complejos de anticuerpo biespecíficos, se fijan sobre una superficie sólida. La

superficie sólida puede ser, por ejemplo, una microplaca o una placa de ELISA.

Además se proporciona el uso de una molécula de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, un
5 complejo de proteína biespecífico descrito en el presente documento para detectar en una muestra la presencia de un primer y un segundo péptido, por lo que dichas moléculas se usan como agentes de detección.

Las moléculas de la presente divulgación, tales como
10 los complejos de anticuerpo biespecífico descritos en el presente documento, pueden conjugarse con un marcador fluorescente que facilita la detección de los complejos anticuerpo-antígeno unidos. Dichos complejos de anticuerpo biespecíficos pueden usarse para microscopía de
15 inmunofluorescencia. Como alternativa, también pueden usarse los complejos de anticuerpo biespecíficos para transferencias de Western o ELISA.

En una realización, se proporciona un proceso para purificar una molécula de acuerdo con la presente
20 divulgación o un componente de la misma.

En una realización, se proporciona un proceso para purificar una molécula de acuerdo con la presente divulgación o un componente de la misma que comprende las etapas de: llevar a cabo una cromatografía de intercambio
25 aniónico en modo de no unión de tal forma que las impurezas se retienen en la columna y el anticuerpo se mantiene en la fracción no unida. La etapa puede llevarse a cabo, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 6-8.

El proceso puede comprender además una etapa de
30 captura inicial que emplea cromatografía de intercambio

catiónico llevada a cabo, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4 a 5.

El proceso puede comprender además etapas de cromatografía adicionales para asegurar que el producto y las impurezas relacionadas con el proceso se vuelven a disolver de manera adecuada de la corriente de producto.

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

"Forma purificada", tal como se usa anteriormente, pretende hacer referencia a una pureza de al menos el 90%, tal como un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p o más de pureza.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, "comprende" debe interpretarse como "incluye".

Los aspectos de la divulgación que comprenden determinados elementos también pretenden extenderse a realizaciones alternativas "que consisten" o "consisten esencialmente" en los elementos relevantes.

Las realizaciones recitadas de manera positiva pueden emplearse en el presente documento como base para una renuncia.

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan específicamente por referencia.

Los subtítulos del presente documento se emplean para ayudar a estructurar la memoria descriptiva y no pretenden usarse para construir el significado de los términos técnicos del presente documento.

Las secuencias de la divulgación se proporcionan en la figura 35.

En el contexto de la presente memoria descriptiva,

"comprende" debe interpretarse como "incluye".

Los aspectos de la divulgación que comprenden determinados elementos también pretenden extenderse a realizaciones alternativas "que consisten" o "consisten esencialmente" en los elementos relevantes.

Las realizaciones recitadas de manera positiva pueden emplearse en el presente documento como base para una renuncia.

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan específicamente por referencia.

Epígrafes

1. Una molécula de anticuerpo que comprende un dominio de unión específico para CD22, en donde el dominio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una:

CDRH1 de fórmula (I):

GX₁X₂FSX₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 1)

en donde X₁ es F, I o L (tal como F), X₂ es S o D, X₃ es S, N o G (tal como S), X₄ es S, Y, L o G, X₅ es Y o está ausente, X₆ es W, Y o D (tal como W o Y, en particular, Y), X₇ es M o I y X₈ es C o S (en particular, S);

CDRH2 de fórmula (II):

X₉IX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆TX₁₇YAX₁₈WAKG (SEQ ID NO: 2)

en donde X₉ es C o S, X₁₀ es Y, D, V o N, X₁₁ es T, P, I, G, S o A, X₁₂ es G, S, o A (en particular, G), X₁₃ es S, I o T, X₁₄ es S, N o está ausente, X₁₅ es G, D, S, A o T, X₁₆ es D, T, S, N, V o G, X₁₇ es Y, D o A y X₁₈ es T o S (en particular, S);

CDHR3 de fórmula (III):

X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃L (SEQ ID NO: 3)

en donde X_{19} es A o está ausente, X_{20} es G, Y o está ausente, X_{21} es P, G o está ausente, X_{22} es Y, S, D, E o está ausente, X_{23} es V, G o W, X_{24} es G, S, Y o V, X_{25} es Y, S, G o N, X_{26} es G, A, S o T, X_{27} es Y, A, G o D, X_{28} es W, D, I, Y o H, X_{29} es L, G, S, Y o K, X_{30} es V, Q, C, S, G, T o D, X_{31} es Y, A o R, X_{32} es L o F, X_{33} es N, Y o D (en particular, D), y

un dominio variable de cadena ligera (VL).

2. Una molécula de anticuerpo que comprende un dominio de unión específico para CD22, en donde el dominio de unión comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una:

CDRL1 de fórmula (IV):

QX₃₄SX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂LX₄₃ (SEQ ID NO: 4)

en donde X_{34} es A o S (en particular, A), X_{35} es Q o E (en particular, Q), X_{36} es S, N o T (en particular, S), X_{37} es I o V, X_{38} es S, Y o G (tal como S o Y), X_{39} es T, S, G o N (tal como S o N), X_{40} es A, G, N, Y, T o R, X_{41} está ausente o es N o K (en particular, está ausente), X_{42} está ausente o es E o D (en particular, está ausente) y X_{43} es A o S (en particular, A);

CDRL2 de fórmula (V):

X₄₄X₄₅SX₄₆LX₄₇S (SEQ ID NO: 5)

en donde X_{44} es G, Y, L, A o S, X_{45} es A, S o T (en particular, A), X_{46} es T, R o K (en particular, T) y X_{47} es A o S (en particular, A);

CDRL3 tiene la fórmula (VI):

AGYKSX₄₈X₄₉DX₅₀X₅₁TT (SEQ ID NO: 6)

en donde X_{48} es D o E (en particular, D), X_{49} es S, A o T, X_{50} es D o E (en particular, D) y X_{51} es G, A o S; o

CDRL3 de fórmula (VII):

QX₅₂X₅₃X₅₄X₅₅X₅₆SX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄ (SEQ ID NO: 7)

en donde X₅₂ es S, I o G (tal como S o G), X₅₃ es Y, H o G (en particular, Y), X₅₄ es Y, D o F (en particular, Y), X₅₅ es G, S o Y (tal como S o Y), X₅₆ es T, A o S (en particular, S), X₅₇ es S, G, V o D, X₅₈ es G, S, L o está ausente, X₅₉ es G, R, S o N, X₆₀ es S, D o V (tal como S o D), X₆₁ es W, Y o está ausente (tal como W o Y), X₆₂ es A, T, G o está ausente, X₆₃ es N o está ausente (en particular, está ausente), X₆₄ es A o está ausente (en particular, está ausente) y

un dominio variable de cadena pesada (VH).

3. Una molécula de anticuerpo que comprende un dominio de unión específico para CD22, en donde el dominio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende:

CDRH1 de fórmula (I):

GX₁X₂FSX₃X₄X₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 1)

en donde X₁ es F, I o L (tal como F), X₂ es S o D, X₃ es S, N o G (tal como S), X₄ es S, Y, L o G, X₅ es Y o está ausente, X₆ es W, Y o D (tal como W o Y, en particular, Y), X₇ es M o I y X₈ es C o S (en particular, S);

CDRH2 de fórmula (II):

X₉IX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆TX₁₇YAX₁₈WAKG (SEQ ID NO: 2)

en donde X₉ es C o S, X₁₀ es Y, D, V o N, X₁₁ es T, P, I, G, S o A, X₁₂ es G, S, o A (en particular, G), X₁₃ es S, I o T, X₁₄ es S, N o está ausente, X₁₅ es G, D, S, A o T, X₁₆ es D, T, S, N, V o G, X₁₇ es Y, D o A y X₁₈ es T o S (en particular, S);

CDHR3 de fórmula (III):

X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃L (SEQ ID NO: 3)

en donde X_{19} es A o está ausente, X_{20} está ausente o es G o Y, X_{21} está ausente o es P o G, X_{22} está ausente o es Y, S, D o E, X_{23} es V, G, Y o W, X_{24} es G, Y, S o V, X_{25} es Y, S, G o N, X_{26} es G, A, S o T, X_{27} es Y, G o D, X_{28} es D, I, Y, W
 5 o H, X_{29} es L, G, S, Y o K, X_{30} es V, Q, C, S, G, T o D, X_{31} es Y, A o R, X_{32} es L o F, X_{33} es N, Y o D (en particular, D) y

un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende

10 CDRL1 de fórmula (IV):

$QX_{34}SX_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}LX_{43}$ (SEQ ID NO: 4)

en donde X_{34} es A o S (en particular, A), X_{35} es Q o E (en particular, Q), X_{36} es S, N o T (en particular, S), X_{37} es I o V, X_{38} es S, Y o G (tal como S o Y), X_{39} es T, S, G o
 15 N (tal como S o N), X_{40} es A, G, N, Y, T o R, X_{41} está ausente o es N o K (en particular, está ausente), X_{42} está ausente o es E o D (en particular, está ausente) y X_{43} es A o S (en particular, A);

CDRL2 de fórmula (V):

20 **$X_{44}X_{45}SX_{46}LX_{47}S$** (SEQ ID NO: 5)

en donde X_{44} es G, Y, L, A o S, X_{45} es A, S o T (en particular, A), X_{46} es T, R o K (en particular, T) y X_{47} es A o S (en particular, A);

CDRL3 tiene la fórmula (VI):

25 **$AGYKSX_{48}X_{49}DX_{50}X_{51}TT$** (SEQ ID NO: 6)

en donde X_{48} es D o E (en particular, D), X_{49} es S, A o T, X_{50} es D o E (en particular, D) y X_{51} es G, A o S; o

CDRL3 de fórmula (VII):

$QX_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}SX_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}$ (SEQ ID NO: 7)

30 en donde X_{19} es A o está ausente, X_{20} es G, Y o está ausente, X_{21} es P, D, G o está ausente, X_{22} es Y, S, D, E o

está ausente, X₂₃ es V, G o W, X₂₄ es G, S, Y o V, X₂₅ es Y, S, G o N, X₂₆ es G, A, S o T, X₂₇ es Y, A, G o D, X₂₈ es W, D, I, Y o H, X₂₉ es L, G, S, Y o K, X₃₀ es V, Q, C, S, G, T o D, X₃₁ es Y, A o R, X₃₂ es L o F, X₃₃ es N, Y o D (en particular, D) y

un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende.

4. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3, en donde la CDRH1 tiene la fórmula (Ia):

GX₁X₂FSX₃X₄X₅YX₇X₈ (SEQ ID NO: 8)

en donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₇ y X₈ se han definido anteriormente para la fórmula (I).

5. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 4, en donde la CDRH1 tiene la fórmula (Ib):

GX₁X₂FSX₃X₄X₅YX₇S (SEQ ID NO: 9)

en donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₇ son como se han definido anteriormente para la fórmula I.

6. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 5, en donde la CDRH2 tiene la fórmula (IIa):

X₉IX₁₀X₁₁GX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆TX₁₇YAX₁₈WAKG (SEQ ID NO: 10)

en donde X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆, X₁₇ y X₁₈ son como se han definido anteriormente para la fórmula II.

7. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 6, en donde la CDRH2 tiene la fórmula (IIb):

X₉IX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆TX₁₇YASWAKG (SEQ ID NO: 11)

en donde X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆ y X₁₇ son como se han definido anteriormente para la fórmula II, en particular, una secuencia de fórmula (IIb) en donde X₁₂ es G.

8. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 7, en donde la CDRH3 tiene la fórmula (IIIa):

X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂DL (SEQ ID NO: 12)

5 en donde X₁₉, X₂₀, X₂₁, X₂₂, X₂₃, X₂₄, X₂₅, X₂₆, X₂₇, X₂₈, X₂₉, X₃₀, X₃₁ y X₃₂ son como se han definido anteriormente para la fórmula III.

9. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 8, en donde la CDRL1 tiene la fórmula (IVa):

QASX₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂LX₄₃ (SEQ ID NO: 13)

en donde X₃₅, X₃₆, X₃₇, X₃₈, X₃₉, X₄₀, X₄₁, X₄₂ y X₄₃ son como se han definido anteriormente para la fórmula IV.

10. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 9, en donde la CDRL1 tiene la fórmula (IVb):

QASQX₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂LX₄₃ (SEQ ID NO: 14)

en donde X₃₆, X₃₇, X₃₈, X₃₉, X₄₀, X₄₁, X₄₂ y X₄₃ son como se han definido anteriormente para la fórmula IV.

11. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 9 o 10, en donde la CDRL1 tiene la fórmula (IVc):

QASQSX₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂LX₄₃ (SEQ ID NO: 15)

en donde X₃₇, X₃₈, X₃₉, X₄₀, X₄₁, X₄₂ y X₄₃ son como se han definido anteriormente para la fórmula IV.

12. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 9 a 11, en donde la CDRL1 tiene la fórmula (IIId):

QASQSX₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₂LX₄₃ (SEQ ID NO: 16)

en donde X₃₇, X₃₈, X₃₉, X₄₀, X₄₂ y X₄₃ son como se han definido anteriormente para la fórmula IV.

13. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 9 a 11, en donde la CDRL1 tiene la fórmula (IVE):

QASQSX₃₇X₃₈X₃₉X₄₀LX₄₃ (SEQ ID NO: 17)

5 en donde X₃₇, X₃₈, X₃₉, X₄₀ y X₄₃ son como se han definido anteriormente para la fórmula IV.

14. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 9 a 13, en donde la CDRL1 tiene la fórmula (IVf):

10 **QASQSX₃₇X₃₈X₃₉X₄₀LA** (SEQ ID NO: 18)

en donde X₃₇, X₃₈, X₃₉ y X₄₀ son como se han definido anteriormente para la fórmula IV.

15 15. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 14, en donde la CDRL2 tiene la fórmula (Va):

X₄₄ASX₄₆LX₄₇S (SEQ ID NO: 19)

en donde X₄₄, X₄₆ y X₄₇ son como se han definido anteriormente para la fórmula V.

20 16. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 15, en donde la CDRL2 tiene la fórmula (Vb):

X₄₄ASX₄₆LAS (SEQ ID NO: 20)

en donde X₄₄ y X₄₆ son como se han definido anteriormente para la fórmula V.

25 17. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la CDRL2 tiene la fórmula (Vc):

X₄₄ASTLAS (SEQ ID NO: 21)

en donde X₄₄ es como se ha definido anteriormente para la fórmula V.

30 18. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 17, en donde la CDRL3 tiene la fórmula (VIa):

AGYKSX₄₈X₄₉DX₅₀X₅₁TT

(SEQ ID NO: 22)

en donde X₄₉, X₅₀ y X₅₁ son como se han definido anteriormente para la fórmula V.

19. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 18, en donde la CDRL3 tiene la fórmula (VIb):

AGYKSDX₄₉DDX₅₁TT

(SEQ ID NO: 23)

en donde X₄₉ y X₅₁ son como se han definido anteriormente para la fórmula VI.

20. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 17, en donde la CDRL3 tiene la fórmula (VIIa):

QX₅₂YX₅₄X₅₅X₅₆SX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄

(SEQ ID NO: 24)

en donde X₅₂, X₅₄, X₅₅, X₅₆, X₅₇, X₅₈, X₅₉, X₆₀, X₆₁, X₆₂, X₆₃ y X₆₄ son como se han definido anteriormente para la fórmula VII.

21. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 20, en donde la CDRL3 tiene la fórmula (VIIf):

QX₅₂YYX₅₅X₅₆SX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄

(SEQ ID NO: 25)

en donde X₅₂, X₅₅, X₅₇, X₅₈, X₅₉, X₆₀, X₆₁, X₆₂, X₆₃ y X₆₄ son como se han definido anteriormente para la fórmula VII.

22. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 21, en donde la CDRL3 tiene la fórmula (VIIf):

QX₅₂YYX₅₅SSX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄

(SEQ ID NO: 26)

en donde X₅₂, X₅₅, X₅₆, X₅₇, X₅₈, X₅₉, X₆₀, X₆₁, X₆₂, X₆₃ y X₆₄ son como se han definido anteriormente para la fórmula VII.

23. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 21 o 22, en donde la CDRL3 tiene la fórmula (VIIf):

QX₅₂YYX₅₅SSX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₄

(SEQ ID NO: 27)

en donde X₅₂, X₅₅, X₅₇, X₅₈, X₅₉, X₆₀, X₆₁, X₆₂ y X₆₄ son como se han definido anteriormente para la fórmula VII.

24. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 21 o 22, en donde la CDRL3 tiene la fórmula (VIIe):

QX₅₂YYX₅₅SSX₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂ (SEQ ID NO: 28)

5 en donde X₅₂, X₅₅, X₅₇, X₅₈, X₅₉, X₆₀, X₆₁, X₆₂ son como se han definido anteriormente para la fórmula VII.

25. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3, en donde la CDRH1 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 29-39, la CDRH2 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 40-59 y la CDRH3 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 60-68.

26. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 29 o 30, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 40 o 41 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 60.

27. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 31 o 32, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 42 o 43 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 61 o 62.

20 28. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 o 25, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 44 o 45 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 63.

25 29. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 o 25, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 35 o 36, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 46 o 47 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 64.

30 30. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 o 25, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 o 53 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 65, 66 o 67.

31. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 o 25, en donde la CDR H1 es la SEQ ID NO: 38 o 39, la CDR H2 es la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 o 59 y la CDR H3 es la SEQ ID NO: 68.

5 32. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 31, en donde la CDRL1 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 69-74, la CDRL2 se selecciona independientemente entre las SEQ ID NO: 75-80 y la CDRL3 se selecciona
10 independientemente entre las SEQ ID NO: 81-101.

33. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 32, en donde la CDR L1 es la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 81.

15 34. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 32, en donde la CDR L1 es la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 82.

35. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 32, en donde la
20 CDR L1 es la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 77 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

36. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 32, en donde la
25 CDR L1 es la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 99.

37. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 32, en donde la CDR L1 es la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 es la SEQ ID NO:
30 100.

38. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 25 a 32, en donde la CDR L1 es la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 es la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 es la SEQ ID NO: 101.

39. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 38, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 29 o 30, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 40 o 41 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 60; y en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 69, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 75 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 81.

40. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 38, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 31 o 32, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 42 o 43 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 61 o 62; y en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 70, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 76 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 82.

41. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 38, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 33 o 34, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 44 o 45 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 63; y en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 71, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 77 y la

CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98.

42. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 38, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 35 o 36, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 46 o 47 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 64; y en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 72, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 78 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 99.

43. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 38, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 37, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 o 53 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 65, 66 o 67; y en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 73, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 79 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 100.

44. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 25 a 38, en donde la CDR H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 38 o 39, la CDR H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 o 59 y la CDR H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 68; y en donde la CDR L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 74, la CDR L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 80 y la CDR L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 101.

45. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 44, en donde la VH y la VL están humanizadas.

5 46. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 45, en donde el dominio variable de la cadena pesada (VH) comprende una región de armazón humana, en donde el resto en al menos una de las posiciones 11, 23, 24, 37, 47, 48, 49, 67, 71, 73, 76, 78 y 94 es un resto donante y el dominio variable de la cadena ligera (VL) comprende
10 una región de armazón humana, en donde el resto en al menos una de las posiciones 1, 2, 3, 36, 63, 65, 66, 70 y 71 es un resto donante.

47. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 o las reivindicaciones 45
15 o 46, que comprende una VH seleccionada independientemente entre la SEQ ID NO: 107, 108, 109, 110, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 127, 128, 129, 130, 136, 137, 138, 139, 145, 146, 147, 148, 154, 155, 156 y 157.

48. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno
20 cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 47, que comprende un dominio variable VL que comprende una secuencia seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 106, 115, 126, 135, 144 y 153.

49. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno
25 cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 47 o 48, que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 107, 108, 109 y 110 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 106.

50. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno
30 cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 47 o 48, que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO:

116, 117, 118, 119, 120 y 121 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 115.

51. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 47 o 48, que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 127, 128, 129 y 130 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 126.

52. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 47 o 48, que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 136, 137, 138 y 139 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 135.

53. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 47 o 48, que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 145, 146, 147 y 148 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 144.

54. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 3 y 47 o 48, que comprende una VH seleccionada independientemente entre las SEQ ID NO: 154, 155, 156 y 157 y una VL con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 153.

55. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 54, en donde cada dominio de unión comprende dos dominios variables de anticuerpo.

56. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 55, en donde los dos dominios variables de anticuerpo son un par de VH/VL.

57. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 45, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que

tiene al menos un 80 de identidad o similitud respecto del dominio variable de cadena ligera de las SEQ ID NO: 106, 115, 126, 135, 144 y 153 y en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos
5 un 80% de identidad o similitud respecto del dominio variable de cadena pesada de las SEQ ID NO: 107, 108, 109, 110, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 127, 128, 129, 130, 136, 137, 138, 139, 145, 146, 147, 148, 154, 155, 156 y 157.

58. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno
10 cualquiera de los epígrafes 1-57, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

59. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1-57, en donde el anticuerpo es un fragmento scFv, Fv, Fab o Fab'.

15 60. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 57, en donde la molécula es una proteína multiespecífica, tal como una biespecífica o triespecífica.

20 61. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con el epígrafe 60, en donde la molécula multiespecífica comprende un dominio de unión que es específico para CD22 y un dominio de unión que es específico para CD79a y/o CD79b.

25 62. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 61, en donde el formato de la molécula se selecciona entre un diabody, scdiabody, triabody, scFv en tándem, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-scFv, Fab-dsscFv, Fab-(dsscFv)₂ diFab, diFab', tribody, scFv-Fc en tándem, scFv-Fc-scFv, scdiabody-Fc, scdiabody-CH3, Ig-scFv, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V, Duobody y DVD-Ig.

30 63. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 62, que comprende un

dominio de unión específico para albúmina sérica, tal como albúmina sérica humana.

64. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 63, en la que el dominio o
5 los dominios de unión están humanizados.

65. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 64, en la que se ha sustituido un aminoácido en una o más CDR por otro aminoácido.

10 66. Una composición que comprende una o más moléculas de anticuerpo como se han definido en uno cualquiera de los epígrafes 1 a 65.

67. Una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo como se ha definido en uno
15 cualquiera de los epígrafes 1 a 65.

68. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos definida en el epígrafe 67.

69. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 65 o una composición de
20 acuerdo con la reivindicación 66, para su uso en terapia.

70. Uso de una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 65 o una composición de acuerdo con el epígrafe 66, para su uso en terapia, en particular, para el tratamiento de una afección o trastorno
25 descrito en el presente documento.

71. Un método para tratar a un paciente que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de los epígrafes 1 a 65 o de una composición de acuerdo con
30 el epígrafe 66.

Bibliografía

1. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries. Hanes J, Jermutus L, Weber-Bornhauser S, Bosshard HR, Plückthun A. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 14130-14135

2. Directed *in Vitro* Evolution and Crystallographic Analysis of a Peptide-binding Single Chain Antibody Fragment (scFv) with Low Picomolar Affinity. Zhand C, Spinelli S, Luginbuhl B, Amstutz P, Cambillau C, Pluckthun A. (2004) J. Biol. Chem. 279, 18870-18877

3. Antigen recognition by conformational selection. Berger C, Weber-Bornhauser S, Eggenberger Y, Hanes J, Pluckthun A, Bosshard H. R. (1999) F.E.B.S. Letters 450, 149-153

15 EJEMPLOS

El término Fab-Kd-Fab tal como se usa en los ejemplos, describe el complejo de proteína biespecífico que tiene la fórmula A-X:Y-B, en donde:

A-X es una primera proteína de fusión;
20 Y-B es una segunda proteína de fusión;
X:Y es un anclaje heterodimérico;
A comprende un fragmento Fab específico para un antígeno, tal como CD22 o CD79;
B comprende un fragmento Fab específico para un
25 antígeno, tal como CD22 o CD79;
X es un primer compañero de unión de un par de unión, tal como un scFv;
Y es un segundo compañero de unión del par de unión, tal como un péptido; y
30 : es una interacción (tal como una interacción de unión) entre X e Y.

Ejemplo 1 - Producción de Fab'-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab'-B (Fab-péptido [B-Y]) para ensayos funcionales

Estrategia de clonación

El ADN de la región variable de anticuerpo se generó mediante la PCR o síntesis génica de secuencia de ADN flanqueante a sitios de enzimas de restricción. Estos sitios fueron *HindIII* y *XhoI* para las cadenas pesadas variables y *HindIII* y *BsiWI* para las cadenas ligeras variables. Esto hace que la región variable pesada sea susceptible de ligarse en los dos vectores de cadena pesada (pNAFH con FabB-Y y pNAFH con FabA-Xds [estabilizado por disulfuro]) ya que tienen sitios de restricción complementarios. Esto liga la región variable cadena arriba (o en dirección 5') a las regiones constantes murinas y a la región Y (GCN4) o scFv X (52SR4), creando una fase de lectura completa. Las cadenas ligeras se clonaron en vectores de región kappa constante murina propios estándar (pMmCK o pMmCK S171C) que nuevamente, usan los mismos sitios de restricción complementarios. El vector pMmCK S171C se usa en caso de que la región variable se aísle de un conejo. Los eventos de clonación se confirmaron por secuenciación usando cebadores que flanqueaban la fase abierta de lectura completa.

Cultivo de CHO-S

Se preadaptaron células CHOS en suspensión al medio CDCHO (Invitrogen) complementado con glutamax 2mM (100x). Las células se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico con agitación a 140rpm en un incubador con agitador (Kuner AG, Birsfelden, Suiza) y se cultivaron a 37°C complementadas con un 8% de CO₂.

Transfección por electroporación

Antes de la transfección, se determinaron el número de células y su viabilidad usando el contador celular CEDEX (Innovatis AG. Bielefeld, Alemania) y se transfirió la cantidad necesaria de células (2×10^8 células/ml) a tubos cónicos para centrifugación y se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en solución salina equilibrada de Earl estéril y se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos más. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos hasta la densidad celular deseada.

Se mezcló el ADN del vector a una concentración final de 400 µg para 2×10^8 células/ml y se pipetearon 800 µl en cubetas (Biorad) y se electroporaron usando un sistema de electroporación propio.

Las células transfectadas se transfirieron directamente a matraces Erlenmeyer de 1X3L que contenían medio ProCHO 5 enriquecido con glutamax 2mM y solución de antibiótico antimetabólico (100X) (1 en 500) y se cultivaron las células en un incubador con agitación Kuhner configurado a 37°C, 5% de CO₂ y agitación a 140 rpm. Se añadió suplemento de alimento de 2g/L de ASF (AJINOMOTO) a las 24h después de la transfección y se redujo la temperatura a 37°C durante un cultivo de 13 días más. En el día cuatro, se añadió al cultivo butirato sódico 3mM (sal sódica del ácido n-butírico, Sigma, B-5887).

En el día 14, los cultivos se transfirieron a tubos y se separó el sobrenadante de las células después de centrifugar durante 30 minutos a 4000rpm. Los sobrenadantes retenidos se filtraron adicionalmente a través de filtros SARTO BRAN P Millipore de 0.22 µm seguido de filtros Gamma

Gold de 0.22 μ m. Los niveles de expresión finales se determinaron mediante G-HPLC de proteínas.

Purificación a gran escala (1.0L)

El Fab-A y el Fab-B se purificaron por captura de
5 afinidad usando los sistemas AKTA Xpress y columnas
preempaquetadas de níquel HisTrap Excel (GE Healthcare).
Los sobrenadantes de cultivo se esterilizaron por
filtración de 0.22 μ m y se ajustó el pH hasta la neutralidad,
en caso necesario, con un ácido o base débil antes de
10 cargarlo en las columnas. Se usó una etapa de lavado
secundaria, que contenía imidazol 15-25mM, para desplazar
cualquier proteína de la célula hospedadora unida
débilmente/moléculas de unión a His no específicas de la
resina de níquel. La elución se llevó a cabo con fosfato
15 sódico 10mM, pH7.4 + NaCl 1M + imidazol 250mM y se
recogieron fracciones de 2ml. Se detuvo un volumen de
columna en el sistema de elución durante 10 minutos para
estrechar el pico de elución y por consiguiente, reducir el
volumen de elución total. Se agruparon las fracciones más
20 limpias y se intercambió el tampón en PBS (Sigma), pH7.4 y
se filtró a 0.22 μ m. Los grupos finales se ensayaron
mediante A280 Scan, SE-HPLC (método G3000), SDS-PAGE
(reducida y no reducida) y para endotoxinas usando el
sistema PTS Endosafe.

25 **Ejemplo 2 - Uso de Fab'-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab'-b
(Fab-péptido [B-Y]) en formato de complejo de proteína
biespecífica anclada heterodiméricamente para demostrar que
las combinaciones biespecíficas para CD79/CD22 pero no las
bivalentes inhiben la señalización de Akt**

30 Se agruparon PBMC humanas procedentes de conos de
aféresis de plaquetas en forma de alícuotas congeladas.

Antes de llevar a cabo un ensayo, se descongelaron las células, se lavaron en DMEM (Life Technologies) y se dejó que se aclimatasen a un ambiente de 37⁰C/5% de CO₂. Durante este periodo, se crearon matrices de anticuerpos biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares (200nM) de Fab'-A (Fab-scFv) y Fab'-B (Fab-péptido) con especificidad antigénica por las proteínas de la superficie celular CD22 y CD79b en DMEM que contenía suero de ternero al 10% y glutamina 2mM. Esta matriz se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Posible matriz de combinaciones biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.

(A-X) F ab A	(B-Y) Fab B	
	CD22-Y	CD79b-Y
C D22-X	CD22-X:Y- CD22	CD22- X:Y-CD79b
C D79b-X	CD79b- X:Y-CD22	CD79b- X:Y-CD79b

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)

Fab'A-X y Fab'B-Y se incubaron conjuntamente durante 90 minutos (en un ambiente a 37⁰C/5% de CO₂) antes de mezclarlos con 2.5x10⁵ PBMC en placas de 96 pocillos de fondo en V. Después, se incubaron conjuntamente PBMC más combinaciones biespecíficas o bivalentes durante 90 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se activaron los linfocitos B mediante la adición de 200nM de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 8 minutos a 37⁰C. Después, se detuvo la reacción de

señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytotfix (BD Biosciences). Después se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de centrifugarlas a 500g durante 5 minutos. Se desechó el exceso de sobrenadante del sedimento celular que se resuspendió en tampón de flujo (PBS+BSA al 1%+NaN₃ al 0.01%) y se lavó una vez más. Después, se resuspendieron las células en tampón Perm III (BD Biosciences) enfriado en hielo durante 30 minutos antes de lavarlas dos veces en tampón de flujo.

Después, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD20 marcado fluorescentemente (BD Biosciences) y un anticuerpo marcado fluorescentemente anti-fosfo Akt que reconoce un resto de serina modificado en la posición 473 de la proteína. Después, se resuspendieron e incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas dos veces más y se resuspendieron en 25µl de tampón de flujo. Se midió la expresión celular de CD20 y Akt usando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™ (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de Akt para cada pocillo. Después, se expresaron todos los datos como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). El efecto relativo de las combinaciones d CD22 y CD79b se muestra en la tabla 5 (↓= inhibición, ↑=estimulación y ↔ = sin efecto general).

Tabla 5: Tabla de la potencia relativa de la inhibición de Akt fosforilada para combinaciones

biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.

5

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B	
	CD22-Y	CD79b-Y
CD22-X	↑↑	↓↓↓
CD79b-X	↓↓↓	↔

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4).

10

Estos datos también se muestran en forma de diagrama de barras (figura 1): los datos representan valores medios y las barras de error son intervalos de confianza al 95%. Los datos muestran que las combinaciones de CD22 con CD79b pueden inhibir la expresión de fosfo-Akt en linfocitos B estimulados con anti-IgM. Por el contrario, la combinación de CD22 con CD22 mostró niveles elevados de expresión de fosfo-Akt.

15

Ejemplo 3 Uso de Fab'-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab'-b (Fab-péptido [B-Y]) en formato de complejo de proteína biespecífica anclada heterodiméricamente para demostrar que las combinaciones biespecíficas para CD79/CD22 pero no las bivalentes inhiben la señalización de PLC γ 2.

20

Se agruparon PBMC humanas procedentes de conos de aféresis de plaquetas en forma de alícuotas congeladas. Antes de llevar a cabo un ensayo, se descongelaron las células, se lavaron en DMEM (Life Technologies) y se dejó que se aclimasen a un ambiente de 37°C/5% de CO₂. Durante este periodo, se crearon matrices de anticuerpos biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares (200nM) de Fab'-a (Fab-scFv [A-X]) y Fab'-B (Fab-péptido [B-Y]) con especificidad antigénica por las proteínas de la

25

30

superficie celular CD22 y CD79b en DMEM que contenía suero de ternero al 10% y glutamina 2mM. Esta matriz se muestra en la tabla 4.

5 Fab'A-X y Fab'B-Y se incubaron conjuntamente durante 90 minutos (en un ambiente a 37⁰C/5% de CO₂) antes de mezclarlos con 2.5x10⁵ PBMC en placas de 96 pocillos de fondo en V. Después, se incubaron conjuntamente PBMC más combinaciones biespecíficas o bivalentes durante 90 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se activaron los
10 linfocitos B mediante la adición de 200nM de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 8 minutos a 37⁰C. Después, se detuvo la reacción de señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytofix (BD Biosciences). Después se dejaron las placas a
15 temperatura ambiente durante 15 minutos antes de centrifugarlas a 500g durante 5 minutos. Se desechó el exceso de sobrenadante del sedimento celular que se resuspendió en tampón de flujo y se lavó una vez más. Después, se resuspendieron las células en tampón Perm III
20 (BD Biosciences) enfriado en hielo durante 30 minutos antes de lavarlas dos veces en tampón de flujo.

Después, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD20 marcado fluorescentemente (BD Biosciences) y un anticuerpo marcado fluorescentemente anti-fosfo PLCγ2 que
25 reconoce un resto de tirosina modificado en la posición 759 de la proteína. Después, se resuspendieron e incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas dos veces más y se resuspendieron en 25μl de tampón de
30 flujo. Se midió la expresión celular de CD20 y PLCγ2 usando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™ (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de PLCγ2 para cada pocillo. Después, se expresaron todos los datos como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). El efecto relativo de las combinaciones d CD22 y CD79b se muestra en la tabla 6 (↓= inhibición, ↑=estimulación y ↔ = sin efecto general).

Tabla 6: Tabla de la potencia relativa de la inhibición de PLCγ2 fosforilada para combinaciones biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B	
	CD22-Y	CD79b-Y
CD22-X	↑	↓↓↓
CD79b-X	↓↓↓	↔

donde X es un scFv e Y es un péptido

Estos datos también pueden expresarse en forma de diagrama de barras (figura 2), los datos representan valores medios y las barras de error son intervalos de confianza al 95%. Los datos muestran que todas las combinaciones de CD22 con CD79b y de CD79b con CD79b pueden inhibir la expresión de fosfo-PLCγ2 en linfocitos B estimulados con anti-IgM. Por el contrario, la combinación de CD22 con CD22 mostró niveles elevados de expresión de fosfo-PLCγ2.

Ejemplo 4 - Uso de Fab'-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab'-b (Fab-péptido [B-Y]) en formato de complejo de proteína

biespecífica anclada heterodiméricamente para demostrar que las combinaciones biespecíficas para CD79/CD22 inhiben la expresión de CD86.

Se agruparon PBMC humanas procedentes de conos de
5 aféresis de plaquetas en forma de alícuotas congeladas.
Antes de llevar a cabo un ensayo, se descongelaron las
células, se lavaron en DMEM (Life Technologies) y se dejó
que se aclimatasen a un ambiente de 37⁰C/5% de CO₂. Durante
este periodo, se crearon matrices de anticuerpos
10 biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares
(200nM) de Fab'-X (Fab-scFv) y Fab'-Y (Fab-péptido) con
especificidad antigénica por las proteínas de la superficie
celular CD22 y CD79b en DMEM que contenía suero de ternero
al 10% y glutamina 2mM. Esta matriz se muestra en la tabla
15 4.

Fab'A-X y Fab'B-Y se incubaron conjuntamente durante
90 minutos (en un ambiente a 37⁰C/5% de CO₂) antes de
mezclarlos con 2.5x10⁵ PBMC en placas de 96 pocillos de
fondo en V. Después, se incubaron conjuntamente PBMC más
20 combinaciones biespecíficas o bivalentes durante 90 minutos
adicionales. Transcurrido este tiempo, los linfocitos B se
activaron mediante la adición de 200nM de F(ab')₂ de cabra
anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 24 horas a
37 °C. Transcurrido este tiempo, las placas se colocaron
25 sobre hielo y se lavaron una vez en tampón enfriado en
hielo (PBS + BSA al 1% + NaN₃ al 0.01%). Después, se
tiñeron las células con un anticuerpo anti-CD19 marcado
fluorescentemente (BD Biosciences) y un anticuerpo anti-
CD86 marcado fluorescentemente y se incubaron sobre hielo
30 durante 1 hora en la oscuridad. Transcurrido este tiempo,
se lavaron las placas dos veces más y se resuspendieron en

25µl de tampón de flujo. Se midió la expresión celular de CD19 y CD86 usando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™ (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de CD86 para cada pocillo. Después, se expresaron todos los datos como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). El efecto relativo de las combinaciones d CD22 y CD79b se muestra en la tabla 7 (↓= inhibición, ↑=estimulación y ↔ = sin efecto general).

Tabla 7: Tabla de la potencia relativa de la inhibición de la expresión de CD86 por linfocitos B para combinaciones biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad por CD22 y CD79b.

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B	
	CD22-Y	CD79b -Y
CD22-X	↑	↓↓↓
CD79b-X	↓↓↓	↓↓

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)

Estos datos también se muestran en forma de diagrama de barras (figura 3), los datos representan valores medios y las barras de error son intervalos de confianza al 95%. Los datos muestran que todas las combinaciones de CD22 con CD79b y de CD79b con CD79b pueden inhibir la expresión de CD86 en linfocitos B estimulados con anti-IgM. Por el contrario, la combinación de CD22 con CD22 mostró niveles elevados de expresión de CD86.

Ejemplo 5 - El efecto inhibidor de CD22 y CD79b solo puede reproducirse cuando los anticuerpos se disponen en una orientación biespecífica

Se agruparon PBMC humanas procedentes de conos de aféresis de plaquetas en forma de alícuotas congeladas. Antes de llevar a cabo un ensayo, se descongelaron las células, se lavaron en DMEM (Life Technologies) y se dejó que se aclimatasen a un ambiente de 37°C/5% de CO₂. Durante este periodo, se crearon combinaciones o mezclas de anticuerpos biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares (200nM) de Fab'-X (Fab-scFv) y/o Fab'-Y (Fab-péptido) con especificidad antigénica por las proteínas de la superficie celular CD22 y CD79b en DMEM que contenía suero de ternero al 10% y glutamina 2mM. Estas combinaciones se muestran en la tabla 8. Para el experimento de la curva de titulación, se diluyeron estas combinaciones en 8 diluciones por etapas de 1 en 2.5 para crear una titulación de dosis para esta combinación.

Tabla 8: Matriz de biespecíficos, bivalentes o mezclas con especificidad por CD22 y CD79b.

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B		
	CD22-Y	CD79b-Y	CD79b-X
CD22-X	CD22-X:Y- CD22	CD22-X:Y- CD79b	CD22-X X- CD79
CD79b-X	CD79b- X:Y-CD22	CD79b- X:Y-CD79b	-
CD22-Y	-	CD22-Y Y- CD79b	-

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)

Fab'A-X y/o Fab'B-Y se incubaron conjuntamente durante 90 minutos (en un ambiente a 37°C/5% de CO₂) antes de

mezclarlos con 2.5×10^5 PBMC en placas de 96 pocillos de fondo en V. Después, se incubaron conjuntamente PBMC más combinaciones de Fab'A-X y/o Fab'B-Y durante 90 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se activaron los
5 linfocitos B mediante la adición de 200nM de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 8 minutos a 37°C. Después, se detuvo la reacción de señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytofix (BD Biosciences). Después se dejaron las placas a
10 temperatura ambiente durante 15 minutos antes de centrifugarlas a 500g durante 5 minutos. Se desechó el exceso de sobrenadante del sedimento celular que se resuspendió en tampón de flujo (PBS+ BSA al 1% + NaN₃ al 0.01%) y se lavó una vez más. Después, se resuspendieron
15 las células en tampón Perm III (BD Biosciences) enfriado en hielo durante 30 minutos antes de lavarlas dos veces en tampón de flujo.

Después, se tiñeron las células con un anticuerpo anti-CD20 marcado fluorescentemente (BD Biosciences), un
20 anticuerpo anti-fosfo Akt que reconoce un resto de serina modificado en la posición 473 y un anticuerpo anti-fosfo PLCγ2 que reconoce un resto de tirosina modificado en la posición 759. Después, se resuspendieron e incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en la
25 oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas dos veces más y se resuspendieron en 25μl de tampón de flujo. Se midió la expresión celular de CD20, Akt y PLCγ2 usando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™
30 (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares y se calcularon

las medias geométricas de los niveles de Akt y PLC γ 2 para cada pocillo. Después, se expresaron todos los datos como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). Las figuras 4 y 5 muestran que únicamente la combinación biespecífica de CD22 y CD79b, pero no las mezclas de anticuerpos para CD22 y CD79b inhibieron la expresión de Akt y PLC γ 2 fosforiladas (los datos representan valores medios y las barras de error son intervalos de confianza al 95%).

Para validar la inhibición observada con la combinación biespecífica de CD22 y CD79b, se tituló esta combinación junto con una mezcla de anticuerpos para CD22 y CD79b y se midió la inhibición intracelular total de I κ B (lectura de señalización) y CD86 (marcador de activación transcurridas 24 horas) en linfocitos B.

Tal como puede observarse en la figura 6, una combinación de CD22-X/CD79b-Y pero no la combinación de CD22-X/CD79b-X fue capaz de inhibir la activación de la señal de NF- κ B después de la estimulación con anti-IgM, medida por el nivel total de proteína I κ B. La CI₅₀, extrapolada usando un ajuste de curva logística de 4 parámetros usando Graphpad Prism 6, fue de 7.5nM (los datos representan valores medios y las barras de error son desviaciones estándar). Adicionalmente, una titulación de la combinación de CD22-X/CD79b-Y pero no la combinación de CD22-X/CD79b-X fue capaz de inhibir la expresión de CD86 inducida por anti-IgM en linfocitos B transcurridas 24 horas (véase la figura 7).

Se agruparon PBMC humanas procedentes de conos de aféresis de plaquetas en forma de alícuotas congeladas. Antes de llevar a cabo un ensayo, se descongelaron las

células, se lavaron en DMEM (Life Technologies) y se dejó que se aclimatasen a un ambiente de 37°C/5% de CO₂. Durante este periodo, se crearon combinaciones biespecíficas diluyendo cantidades equimolares (500nM) de Fab'-X (Fab-scFv) y Fab'-Y (Fab-péptido) con especificidad antigénica por las proteínas de la superficie celular CD22 y CD79b en DMEM que contenía suero de ternero al 10% y glutamina 2mM. Después, se diluyeron estas combinaciones en 8 diluciones por etapas de 1 en 2.5 para crear una titulación de dosis para esta combinación. Se incubaron conjuntamente Fab'-X y Fab'-Y durante 90 minutos (en un ambiente a 37°C/5% de CO₂) antes de añadir 2.5x10⁵ PBMC a placas de 96 pocillos de fondo en V. Después, se añadieron PBMC a combinaciones de Fab'-X y Fab'-Y y se incubaron juntas durante 90 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, los linfocitos B se activaron mediante la adición de 200nM de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 24 horas a 37°C. Para permitir la detección de los marcadores de activación de la superficie celular, las placas se colocaron sobre hielo y se lavaron una vez en tampón enfriado en hielo (PBS + BSA al +1% + NaN₃ al 0.01%). Después, se tiñeron las células con un anticuerpo anti-CD19 marcado fluorescentemente (BD Biosciences) y un anticuerpo anti-CD86 marcado fluorescentemente y se incubaron sobre hielo durante 1 hora en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas dos veces más y se resuspendieron en 25µl de tampón de flujo. Se midió la expresión celular de CD19 y CD86 usando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™. Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™ (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares

y se calculó la media geométrica de los niveles de CD86 para cada pocillo. Después, se expresaron todos los datos como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). Tal como
5 puede observarse en la figura 7, una titulación de la combinación de CD22-X/CD79b-Y fue capaz de inhibir la expresión de CD86 inducida por anti-IgM en linfocitos B transcurridas 24 horas. La CI_{50} , extrapolada usando un ajuste de curva logística de 4 parámetros usando Graphpad
10 Prism 6, fue de 10.3nM (los datos representan valores medios y las barras de error son desviaciones estándar).

Ejemplo 6 - El efecto inhibidor de la proteína específica para CD22 y CD79b puede reproducirse con diferentes regiones V de anticuerpo

15 Immunización: Se obtuvo ADN que codificaba antígenos seleccionados mediante síntesis génica o fuentes comerciales y se clonó en un vector de expresión con un promotor constitutivo fuerte. Después, se transfectó a células de fibroblasto de conejo Rab-9 (ATCC® CRL-1414™)
20 con el ADN plasmídico usando un sistema de electroporación propio. Veinticuatro horas después, se comprobó la expresión del antígeno en las células mediante citometría de flujo y se congelaron en alícuotas en nitrógeno líquido hasta su uso. Se inmunizó con hasta 6 antígenos por conejo
25 mediante expresión conjunta en la misma célula o preparando mezclas de células transfectadas de manera individual o múltiple. Se inmunizó a los conejos con 3 dosis de células.

Descubrimiento de anticuerpos: Se prepararon cultivos de linfocitos B usando un método similar al descrito por
30 Zubler et al. (1985). Brevemente, se cultivaron linfocitos B de bazo o procedentes de PBMC obtenidas de conejos

inmunizados a una densidad de aproximadamente 2000-5000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos marcadas con códigos de barras con 200 µl/pocillo de medio RPMI 1640 (Gibco BRL) complementado con FCS al 10%
5 (PAA Laboratories Ltd.), HEPES al 2% (Sigma Aldrich), L-glutamina al 1% (Gibco BRL), solución de penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco BRL), β-mercaptoetanol al 0.1% (Gibco BRL), sobrenadante de cultivo de esplenocitos activados al 3% y células de timoma murino
10 EL4 mutantes irradiadas con gamma (5×10^4 /pocillo) durante siete días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Se determinó la presencia de anticuerpos específicos de antígeno en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B usando un ensayo de unión homogéneo basado en fluorescencia
15 usado células HEK293 cotransfectadas con los antígenos con los que se había inmunizado a los conejos. La exploración implicó la transferencia de 10 ul de sobrenadante de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos marcadas con códigos de barras a placas de ensayo de paredes negras de
20 384 pocillos marcadas con códigos de barras que contenían células HEK293 transfectadas con antígeno diana (aproximadamente 3000 células/pocillo) usando un manipulador de líquidos Matrix Platemate. La unión se reveló con un conjugado de cabra específico para Fcγ de IgG
25 de conejo-Cy-5 (Jackson). Las placas se leyeron en un sistema de detección celular Applied Biosystems 8200.

Después de la exploración primaria, se consolidaron los sobrenadantes positivos en placas maestras de 96 pocillos marcadas con códigos de barras usando un robot de
30 recogida Aviso Onyx y se congelaron los linfocitos B en las placas de cultivo celular a -80°C. Después, se exploraron

las placas maestras en un ensayo de unión homogéneo basado en fluorescencia con células HEK293 transfectadas por separado con antígenos y perlas Superavidn™ (Bang Laboratories) recubiertas con proteína recombinante como
5 fuente de antígeno. Esto se hizo para determinar la especificidad antigénica para cada pocillo.

Para permitir la recuperación de los genes de región variable de anticuerpo a partir de una selección de pocillos de interés, se llevó una etapa de descodificación
10 para permitir la identificación de los linfocitos B específicos para el antígeno en un pocillo dado que contenían una población heterogénea de linfocitos B. Esto se logró usando el método de focos fluorescentes (Clargo et al., 2014. Mabs 1 de enero de 2014: 6(1) 143-159; documento
15 EP1570267B1). Brevemente, se mezclaron linfocitos B secretores de inmunoglobulina de un pocillo positivo con células HEK293 transfectadas con antígeno diana o con perlas de estreptavidina (New England Biolabs) recubiertas con antígeno diana biotinilado y una dilución final de
20 1:1200 de un conjugado de cabra específico anti-fragmento Fcγ de conejo-FITC (Jackson). Después de incubar de manera estática a 37°C durante 1 hora, se pudieron identificar los linfocitos B específicos de antígeno debido a la presencia de un halo fluorescente que rodeaba a ese linfocito B.
25 Después, se recogieron con un micromanipulador Eppendorf un número de estos clones de linfocitos B individuales identificados usando un microscopio Olympus y se depositaron en un tubo para la PCR. También se usó el método de focos fluorescentes para identificar linfocitos B
30 específicos de antígeno a partir de una población

heterogénea de linfocitos B procedentes directamente de la médula ósea de conejos inmunizados.

Los genes de la región variable de anticuerpo se recuperaron de las células individuales mediante transcripción inversa por (RT)-PCR usando cebadores
5 específicos para la región variable de cadena pesada y ligera. Se llevaron a cabo dos ciclos de PCR, incorporando la PCR secundaria anidada sitios de restricción en los extremos 3' y 5' que permiten la clonación de la región
10 variable en vectores de expresión de mamífero de Fab-X y Fab-Y (VH) de ratón o de kappa de ratón (VL). Se cotransfectaron construcciones de cadena pesada y ligera para los vectores de expresión de Fab-X y Fab-Y en células HEK-293 usando Fectin 293 (Life Technologies) o células
15 Expi293 usando Expifectamine (Life Technologies) y el anticuerpo recombinante se expresó en placas de cultivo tisular de 6 pocillos en un volumen de 5ml. Después de 5-7 días de expresión, se recogieron los sobrenadantes. Los sobrenadantes se probaron en un ensayo de unión homogéneo
20 basado en fluorescencia en células HEK293 transfectadas con antígeno y perlas Superavidin™ (Bang Laboratories) recubiertas con proteína recombinante o células HEK transfectadas con antígeno. Esto se efectuó para confirmar la especificidad de los anticuerpos clonados.

25 ***Producción a pequeña escala de Fab A-X y Fab B-Y***
(Transfección a pequeña escala (50mL) en Expi293)

Se subcultivaron de manera rutinaria las células Expi293 en medio de expresión Expi293™ hasta una
concentración final de 0.5×10^6 células viables/mL y se
30 incubaron en un incubador con agitación orbital (Multitron, Infors HT) a 120 rpm, 8% de CO₂ y 37°C.

En el día de la transfección, se midieron la viabilidad celular y la concentración usando un contador celular automatizado (Vi-CELL, Beckman Coulter). Para lograr una concentración final de células de 2.5×10^6 células viables/mL se añadió el volumen adecuado de suspensión celular a un matraz de agitación Erlenmeyer estéril de 250 mL y se enrasó el volumen a 42.5 mL añadiendo medio de expresión Expi293™ reciente precalentado por cada 50 mL de transfección.

Para preparar los complejos de lípido-ADN para cada transfección, se diluyeron un total de 50 µg de ADN de plásmido de cadena pesada y de cadena ligera en medio Opti-MEM® I (Life Technologies) hasta un volumen total de 2.5 mL y se diluyeron 135 µL de reactivo ExpiFectamine™ 293 (Life Technologies) en medio Opti-MEM® I hasta un volumen total de 2.5 mL. Todas las diluciones se mezclaron cuidadosamente y se incubaron durante no más de 5 minutos a temperatura ambiente antes de añadir cada solución de ADN al reactivo ExpiFectamine™ 293 respectivo diluido para obtener un volumen total de 5 mL. Las mezclas de ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293 se mezclaron cuidadosamente y se incubaron durante 20-30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293.

Tras completar la incubación del complejo de ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293, se añadieron a cada matraz de agitación los 5 mL de complejo de ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293. Los matraces de agitación se incubaron en un incubador de agitación orbital (Multitron, Infors HT) a 120 rpm, 8% de CO₂ y 37°C.

Aproximadamente 16-18 horas después de la transfección, se añadieron a cada matraz de agitación 250 µL de Mejorador de la Transfección ExpiFectamine™ 293 1 (Life Technologies) y 2.5 mL de Mejorador de la Transfección ExpiFectamine™ 293 2 (Life Technologies).

Los cultivos celulares se recogieron 7 días después de la transfección. Las células se transfirieron a tubos de centrifugación de 50 mL (Falcon) y se centrifugaron durante 30min a 4000 rpm, seguido de esterilización por filtración a través de un Stericup de 0.22µm (Merck Millipore). Los sobrenadantes aclarados y estériles se almacenaron a 4°C. Los niveles de expresión finales se determinaron mediante HPLC de proteína G.

Purificación a pequeña escala (50 ml): Tanto Fab-X como Fab-Y se purificaron por separado mediante captura de afinidad usando un sistema de purificación a base de vacío a pequeña escala. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo de 50 ml se esterilizaron por filtración de 0.22µm antes de añadir 500 µL de perlas de Ni Sepharose (GE Healthcare). Después, se volteó la mezcla de sobrenadante y perlas durante aproximadamente una hora antes de retirar el sobrenadante aplicando vacío. Después, se lavaron las perlas con Lavado 1 (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 1 M, pH 6.2) y Lavado 2 (NaCl 0.5 M). La elución se llevó a cabo con acetato de sodio 50 mM, pH4.0 + NaCl 1M. se intercambió el tampón de las fracciones eluidas en PBS (Sigma), pH7.4 y se filtró a 0.22µm. Los grupos finales se ensayaron mediante A280 Scan, SE-UPLC (método BEH200), SDS-PAGE (reducida y no reducida) y para endotoxinas usando el sistema PTS Endosafe.

Se agruparon PBMC humanas procedentes de conos de aféresis de plaquetas en forma de alícuotas congeladas. Antes de llevar a cabo un ensayo, se descongelaron las células, se lavaron en RPMI 1640 (Life Technologies) y se dejó que se aclimatasen a un ambiente de 37°C/5% de CO₂. Durante este periodo, se crearon combinaciones o mezclas de anticuerpos biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares (200nM) de Fab'-X (Fab-scFv) y/o Fab'-Y (Fab-péptido) con especificidad antigénica por las proteínas de la superficie celular CD22 y CD79b en RPMI 1640 que contenía suero fetal bovino al 10%, 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomycin y glutamina 2mM. Estas combinaciones de 3 diferentes Fab-Y para CD79b y 3 diferentes Fab-X para CD22 se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Matriz de proteínas biespecíficas con especificidad por CD22 y CD79b.

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B		
	CD79-Y VR4447	CD79-Y VR4450	CD79b-y VR4246
CD22-X VR0982	CD22-X:Y- CD79b	CD22-X:Y- CD79b	CD22-X:Y- CD79b
CD22-X VR4126	CD22-X:Y- CD79b	CD22-X:Y- CD79b	CD22-X:Y- CD79b
CD22-X VR4130	CD22-X:Y- CD79b	CD22-X:Y- CD79b	CD22-X:Y- CD79b

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)

Fab'A-X y Fab'B-Y se incubaron conjuntamente durante 60 minutos (en un ambiente a 37°C/5% de CO₂) antes de mezclarlos con 2.5x10⁵ PBMC en placas de 96 pocillos de fondo en V. Después, se incubaron conjuntamente PBMC más

combinaciones de Fab'A-X y/o Fab'B-Y durante 90 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se activaron los linfocitos B mediante la adición de 12.5 µg/mL de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 5 10 minutos a 37⁰C. Después, se detuvo la reacción de señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytofix (BD Biosciences). Después se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de centrifugarlas a 500g durante 5 minutos. Se desechó el 10 exceso de sobrenadante del sedimento celular que se resuspendió en tampón de flujo (PBS+ BSA al 1% + NaN₃ al 0.1%+ EDTA 2 mM) y se lavó una vez más. Después, se resuspendieron las células en tampón Perm III (BD Biosciences) enfriado en hielo durante 30 minutos antes de 15 lavarlas dos veces en tampón de flujo.

Después, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD20 marcado fluorescentemente (BD Biosciences) y un anticuerpo anti-fosfo PLCγ2 que reconoce un resto de tirosina modificado en la posición 759. Después, se 20 resuspendieron e incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas dos veces más y se resuspendieron en 40 µl de tampón de flujo. Se midió la expresión celular de CD20 y PLCγ2 usando un citómetro de 25 flujo Intellicyt HTFC™.

Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™ (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de PLCγ2 para cada pocillo. 30 Después, se expresaron todos los datos como el porcentaje

de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células).

Tal como puede observarse en la figura 8, los datos muestran que la combinación de CD22 con CD79b usando todas las diferentes regiones V de anticuerpo puede inhibir la expresión de fosfo-PLC γ 2 en linfocitos B estimulados con anti-IgM.

Ejemplo 7: Exploración con matriz de grandes paneles de complejos de proteínas ancladas heterodiméricamente para identificar nuevas dianas de anticuerpo biespecífico.

Introducción: Tras validar con éxito el formato biespecífico y el método de exploración en los ejemplos anteriores, se expandió la exploración a un mayor número de pares de antígeno. Se generó un panel de pares de región variable (V) de anticuerpo para 23 antígenos diferentes expresados en linfocitos B. Usado el formato Fab-Kd-Fab [es decir, A-X:Y-B en donde A y B son fragmentos Fab] se formó una matriz de complejos de proteínas ancladas heterodiméricamente que representaba múltiples combinaciones de región V de cada una de las 315 diferentes combinaciones de pares de antígenos. Estas combinaciones se exploraron respecto de su capacidad para modular la señalización de BCR (receptor de linfocitos B) en un ensayo de citometría de flujo de alto rendimiento para seleccionar nuevos pares diana para su intervención con un anticuerpo biespecífico.

Los anticuerpos se aislaron como se describe en el ejemplo 6.

Ensayos de exploración

Se descongelaron rápidamente PBMC de donantes usando un baño de agua configurado a 37°C, y se transfirieron cuidadosamente a un tubo Falcon de 50 ml. Después, se diluyeron gota a gota hasta 5 ml en medio de ensayo para minimizar el choque osmótico. Después, se diluyeron las células hasta 20 ml cuidadosamente antes de añadir el diluyente de medio final para enrasar el volumen a 50 ml. Después, se centrifugaron las células a 500 g durante 5 minutos antes de retirar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de medio. Después, se contaron las células y se diluyeron a razón de 1.66×10^6 células/ml antes de dispensar 30 µl por pocillo en una placa de TC de fondo en V proporcionando una concentración final de ensayo de 5.0×10^4 células/pocillo. Después, se almacenó la placa de células cubierta en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ hasta que se necesitaron, dejándolas reposar un mínimo de 1 hora.

Los reactivos Fab-X y Fab-Y se mezclaron en proporciones equimolares a una concentración de ensayo 5x en medio de ensayo y se incubaron durante 90 min a 37°C, 5% de CO₂. Las muestras se prepararon en una placa de polipropileno de 96 pocillos de fondo en U y se cubrieron durante la incubación.

Se añadieron 10 µl de mezcla de Fab-KD-Fab 5x a los pocillos de ensayo adecuados que contenían células y se mezclaron agitando a 1000 rpm durante 30 s antes de incubarlas durante 90 min a 37 °C, 5% de CO₂.

Después, se estimuló a las células con 10µl de anti-IgM humana. La concentración final de ensayo del estímulo varió dependiendo de las lecturas del panel de ensayo, los tres cócteles de anticuerpos A, B y C (detallados a continuación) se estimularon a una concentración final de

ensayo de 50 µg/ml (cócteles A y C) o 25 µg/ml (cóctel B). Después, se mezclaron cuidadosamente las placas de ensayo a 1000 rpm durante 30 s antes de incubarlas a 37°C, 5% de CO₂ durante 5min (cócteles de anticuerpos A y C) o 2 min (cóctel de anticuerpos B). El ensayo se detuvo añadiendo 150 µl de BD CytoFix enfriado en hielo a todos los pocillos y se incubaron durante 15min a TA. Después, se centrifugaron las células fijadas a 500 g durante 5min para sedimentar las células y permitir la retirada del sobrenadante usando un lavador de placas BioTek ELx405. El sedimento se resuspendió agitando vorticialmente la placa a 2400 rpm durante 30 s. Después, se permeabilizaron las células a 4°C añadiendo 100 µl de tampón de permeabilización de células BD III enfriado en hielo durante 30 min. Después, se lavaron las células en 100 µl de tampón de FACS y se centrifugaron a 500 g durante 5min. De nuevo, se retiró el sobrenadante con el ELx405 antes de usarlas para dispensar rápidamente 200 µl de tampón de FACS para eliminar por lavado cualquier resto de tampón de permeabilización. Las células se centrifugaron de nuevo a 500 g y se retiró el sobrenadante mediante inversión. Durante la etapa de centrifugación anterior, se preparó el cóctel de anticuerpo en tampón de FACS y se mantuvo protegido de la luz. Después, se resuspendieron las células agitando vorticialmente (2400 rpm, 30 s) antes de añadir 20 µl de cóctel de anticuerpo a todos los pocillos y agitar la placa durante 30 s a 1000 rpm. Después, se incubaron las células durante 60 min a TA en la oscuridad.

Después, se lavaron dos veces las células en 200 µl de tampón de FACS con una centrifugación a 500 g y se retiró el sobrenadante tras cada etapa. Finalmente, se

resuspendieron las células agitando vorticialmente durante 30 s a 2400 rpm antes de añadir 20 µl finales de tampón de FACS. Después, se leyeron las placas en el instrumento Intellicyt HTFC/ iQue.

5 Tampón de FACS = PBS + BSA al 1% + NaN₃ al 0.05% + EDTA 2mM

Cóctel de anticuerpos A = 1:2 CD20 PerCp-Cy5.5 (BD Biosciences) + 1:5 PLCy2 AF88 + 1:10 Akt AF647 + 1:50 ERK1/2 PE (diluido en tampón de FACS).

10 Cóctel de anticuerpos B = 1:2 CD20 PerCp-Cy5.5 (BD Biosciences) + 1:5 Syk PE + 1:5 BLNK AF647 (diluido en tampón de FACS)

Cóctel de anticuerpos C = 1:5 CD20 PerCp-Cy5.5 (Biolegend) + 1:5 PLCy2 AF488 + 1:10 Akt AF647 + 1:5 Syk PE
15 (diluido en tampón de FACS)

	Reactivo	Proveedor	Número de catálogo
	Anti-IgM humana	Southern Biotech	2022-14
20	CytoFix	BD Biosciences	554655
	Tampón Perm III	BD Biosciences	558050
25	Anti Akt (pS473) AF647	BD Biosciences	561670
	Anti SYK (pY348) PE	BD Biosciences	558529
	Anti PLCy2 (pY759) AF488	BD Biosciences	558507
30	Anti-BLNK(pY84) AF647	BD Biosciences	558443

5	Anti ERK1/2 (pT202/pY204) PE	BD Biosciences	561991
	Anti-CD20 humano PerCp-Cy5.5	BD Biosciences	558021
	Anti-CD20 humano AF488	BD Biosciences	558056
10	Anti-CD20 humano PerCp-Cy5.5	Biolegend	340508
	Suero salino tamponado con fosfato (PBS)	Fisher Scientific	10562765
	RPMI 1640	Life Technologies	31870
15	Suero fetal de ternero (FCS)	Life Technologies	16140
	Glutamax	Life Technologies	35050
	Penicilina/Estreptomicina (P/S)	Life Technologies	15070
20	EDTA	Sigma	03690
	Azida de sodio (NaN ₃)	Sigma	S2002
	Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma	A1470

Las combinaciones de Fab-X + Fab-Y se exploraron con el cóctel de anticuerpos A y B o C solos. Todas las exploraciones se llevaron a cabo en células cone de 2 donantes de sangre diferentes. Los datos se recogieron y evaluaron usando herramientas informáticas comerciales. Se exploró un total de 2500 combinaciones de Fab-X + Fab-Y para 315 diferentes combinaciones de antígeno.

Resultados

Se calculó el porcentaje de inhibición de la inducción de fosforilación de las proteínas de la cascada de señalización de BCR por parte de cada Fab-Kd-Fab [es decir,

A-X:Y-B donde A y B son fragmentos Fab], en este ejemplo buscando nuevas combinaciones de antígenos que inhiban la función de los linfocitos B, marcándose los criterios para una combinación positiva como una inhibición de al menos el
5 30% de al menos dos lecturas de fosfo por al menos una combinación de regiones V. De acuerdo con este umbral, 11 nuevas combinaciones de pares de antígenos de las 315 examinadas cumplían los criterios requeridos. Esto representa una tasa de acierto del 3.5%, lo que demuestra
10 la importancia de explorar grandes números de combinaciones para encontrar aquellos con la actividad deseada y hasta qué punto es rara la actividad de la combinación de CD79b y CD22.

Las figuras 10-12 muestran los datos para la matriz de
15 especificidades de antígeno cruzadas. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de Syk, PLC γ 2 y AKT, respectivamente y representan la media de múltiples combinaciones de región V evaluadas. Se probaron 315 combinaciones de antígeno
20 diferentes y tal como puede observarse, el efecto en la señalización de BCR por las diferentes combinaciones de anticuerpos varió significativamente desde una fuerte inhibición, por ejemplo, antígeno 2 (CD79b) en Fab-X combinado con antígeno 3 (CD22) en Fab-Y (69.66% de
25 inhibición de fosfo Syk) y antígeno 2 (CD79b) en Fab-Y combinado con antígeno 3 (CD22) en Fab-X (52.32 % de inhibición de fosfo Syk) mostrado en la figura 11) hasta activación, por ejemplo, antígeno 6 en X y antígeno 11 en Y (menos 118.10% de fosfo Syk, figura 11).

30 Cada punto de datos que representa la media en % de los valores representados en las figuras 10-12 se muestra

para el antígeno 2 (CD79b) en Fab-X y el antígeno 3 (CD22) en Fab-Y en la figura 13. En este caso, se evaluaron 23 combinaciones diferentes de diferentes regiones V de anticuerpo. En la figura 14 se muestra la misma combinación de antígeno, pero en una orientación alternativa, es decir, antígeno 2 (CD79) en Fab-Y y antígeno 3 (CD22) en Fab-X. En este caso, se evaluaron 9 combinaciones diferentes de diferentes regiones V de anticuerpo. Todas las regiones V muestran inhibición, pero este método puede usarse ventajosamente en la selección de combinaciones óptimas de regiones V.

Ejemplo 8 Comparación de la actividad del uso como diana conjunta de antígeno CD79b más antígeno CD22 en el formato de exploración Fab-Kd-Fab con un formato BYbe biespecífico unido molecularmente.

Introducción: Para comprobar que la actividad del par diana CD79b/CD22 identificado en el complejo de exploración anclado heterodiméricamente Fab-Kd-Fab podía traducirse en una actividad deseada similar en un formato terapéutico unido molecularmente alternativo, se generaron especificidad por el antígeno CD79b (VR4447) y especificidad por el antígeno CD22 (VR4130) en un formato BYbe. Este formato BYbe consta de las regiones V anti-antígeno CD22 (VR4130) en forma de Fv monocatenario (sc) estabilizado por disulfuro (ds) fusionado a la cadena pesada del Fab anti-antígeno CD79b (VR4447) a través de un enlazador SGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17).

Métodos:

La purificación de los BYbe para exploración funcional se llevó a cabo del siguiente modo:

Los formatos BYbe (Fab-dsscFv [scFv del extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab]) para exploración funcional se purificaron del siguiente modo. Los sobrenadantes de cultivo celular de la expresión convencional en expiHEK o CHO se esterilizaron por filtración de 0.22µm. Los sobrenadantes filtrados se cargaron a razón de 2ml/min en columnas de 50ml GammabindPlus Sepharose XK26 (GE Healthcare) equilibradas en PBS a pH7.4 (Sigma Aldrich Chemicals). Después de cargarlas, se lavaron las columnas con PBS a pH7.4 y después se eluyeron con glicina 0.1M/HCl a pH2.7. Se efectuó un seguimiento de la elución por absorbancia a 280nm, se recogió el pico de elución y después se neutralizó con 1/25° del volumen de Tris 2M/HCl a pH8.5. Las muestras neutralizadas se concentraron usando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana con un corte de peso molecular de 10kDa (BYbe) y centrifugación a 4000xg en un rotor basculante. Las muestras concentradas se aplicaron a una columna XK16/60 o XK26/60 Superdex200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS, pH7.4. Las columnas se revelaron con un gradiente isocrático de PBS, pH7.4 a 1ml/min o 2.6ml/min, respectivamente. Las fracciones se recogieron y analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5µm, de 7.8 X 300 mm revelada con un gradiente isocrático de fosfato 0.2M, pH7.0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm. Las fracciones de monómero seleccionadas se agruparon y concentraron a >1 mg/ml usando un concentrador Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor basculante. Se ensayaron las muestras finales; respecto de su

concentración mediante un espectrofotómetro de UV visible de barrido de A280 (Cary 50Bio); respecto del % de monómero mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5 μ m, de 7.8x300 mm revelada con un gradiente isocrático de fosfato 0.2 M, pH7.0 a 1ml/min, con detección por absorbancia a 280nm; mediante un ciclo de SDS-PAGE reductora y no reductora en geles de 1.5 mm de Tris-Glicina al 4-20% (Novex) a 50 mA (por gel) durante 53 minutos; y respecto de endotoxinas mediante el sistema de ensayo portable EndoSafe® de Charles River con cartuchos de prueba de lisado de amebocito Limulus (LAL).

Ensayos funcionales

Ensayo de marcador de activación: Se incubaron conjuntamente Fab' específico para antígeno CD79b-Y y Fab' específico para antígeno CD22-X durante 60 minutos (en un ambiente a 37°C y un 5% de CO₂) a una concentración equimolar. Las concentraciones se titularon partiendo de una molaridad inicial de 100 nM, en diluciones en serie de 1:4. También se tituló el BYbe específico para antígeno CD79b y CD22 partiendo de una molaridad inicial de 100 nM, en diluciones en serie de 1:4. En placas de 96 pocillos de fondo en V, se añadieron 1.5x10⁵ PBMC a los pocillos, a las que se añadieron combinaciones tituladas de Fab'-X y Fab'-Y o BYbe titulado. Las combinaciones de Fab'-X y Fab'-Y o BYbe se incubaron con células durante 90 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se activaron los linfocitos B mediante la adición de 25 μ g/mL de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 24 horas a 37°C más un 5% de CO₂.

A los pocillos se añadieron 100 μ L de tampón de FACS enfriado en hielo (PBS + BSA al 1% + NaN₃ al 0.1% +

2 mM EDTA), se sellaron y cubrieron las placas con hielo húmedo durante aproximadamente 15 minutos, antes de centrifugar a 500 xg durante 5 minutos a 4°C. El exceso de sobrenadante se desechó de los sedimentos celulares y se
5 agitaron las placas a 2000 rpm durante 30 segundos.

Después, se tiñeron las células con un cóctel de anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD71, anti-CD40 y anti-CD86 marcados fluorescentemente (BD Biosciences). Las placas se agitaron brevemente y se incubaron durante 1 hora
10 sobre hielo húmedo en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas dos veces y se resuspendieron en 20 µl de tampón de FACS. Se midió la expresión celular de CD19, CD20 y CD71, CD40 y CD86 usando un citómetro de flujo Intellicyt iQUE® Screener.

Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™ (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de CD71, CD40 y CD86 para cada pocillo. Después, se expresaron todos los datos como
20 el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células).

Ensayo PhosFlow: Se incubaron conjuntamente Fab' específico para antígeno CD79b-Y y Fab' específico para antígeno CD22-X durante 60 minutos (en un ambiente a 37°C y un 5% de CO₂) a una concentración equimolar. Las
25 concentraciones se titularon partiendo de una molaridad inicial de 100 nM, en diluciones en serie de 1:4. También se tituló el BYbe específico para antígeno CD79b y antígeno CD22 partiendo de una molaridad inicial de 100 nM, en
30 diluciones en serie de 1:4. En placas de 96 pocillos de fondo en V, se añadieron 5.0×10^4 PBMC a los pocillos, a

las que se añadieron combinaciones tituladas de Fab'-X y Fab'-Y o BYbe titulado. Las combinaciones de Fab'-X y Fab'-Y o BYbe se incubaron con células durante 90 minutos adicionales. Transcurrido este tiempo, se activaron los linfocitos B mediante la adición de 25 µg/mL de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 15 minutos a 37°C más un 5% de CO₂. Después, se detuvo la reacción de señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytofix (BD Biosciences). Después se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de centrifugarlas a 500 x g durante 5 minutos. Se desechó el exceso de sobrenadante del sedimento celular que se resuspendió en tampón de FACS (PBS+ BSA al 1% + NaN₃ al 0.01% + EDTA 2 mM) y se lavó una vez más. Después, se resuspendieron las células en tampón Perm III (BD Biosciences) enfriado en hielo durante 30 minutos antes de lavarlas dos veces en tampón de flujo.

Después, se tiñeron las células con un anticuerpo anti-CD20 marcado fluorescentemente (BD Biosciences) y anticuerpos anti-PLCγ2 fosforilada, anti-Akt fosforilada y anti-p38 fosforilada (BD Biosciences). Después, se resuspendieron e incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron las placas dos veces más y se resuspendieron en 20 µL de tampón de FACS. Se midió la expresión celular de CD20 y fosfo-PLCγ2, fosfo-Akt y fosfo-p38 usando un citómetro de flujo Intellicyt iQUE®.

Usando el paquete de programas informáticos Forecyt™ (Intellicyt), se identificaron los linfocitos B como distintos de otras poblaciones celulares y se calcularon las medias geométricas de los niveles de PLCγ2, Akt y p38

para cada pocillo. Después, se expresaron todos los datos como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células).

Resultados

5 Ensayo PhosFlow: Los datos en la figura 15 muestran que el uso como diana del antígeno CD79b y el antígeno CD22 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir a PLC γ 2 fosforilada en linfocitos B estimulados con anti-IgM. Los datos en la figura 16 muestran que el uso como diana del antígeno CD79b y el antígeno CD22 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir a P38 fosforilada en linfocitos B estimulados con anti-IgM. Los datos en la figura 17 muestran que el uso como diana del antígeno CD79b y el antígeno CD22 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir a Akt fosforilada en linfocitos B estimulados con anti-IgM.

15 Ensayo de marcador de activación: Tal como puede observarse en la figura 18, los datos muestran que el uso como diana del antígeno CD79b y el antígeno CD22 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la expresión de CD71 en linfocitos B estimulados con anti-IgM. Los datos en la figura 19 muestran que el uso como diana del antígeno CD79b y el antígeno CD22 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la expresión de CD40 en linfocitos B estimulados con anti-IgM. Los datos en la figura 20 muestran que el uso como diana del antígeno CD79b y el antígeno CD22 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la expresión de CD86 en linfocitos B estimulados con anti-IgM.

25 **Ejemplo 9 - Comparación de la actividad del uso como diana conjunta del antígeno CD79b más el antígeno CD22 en un formato BYbe biespecífico unido molecularmente con la**

adición adicional de un dominio de unión anti-albúmina para la prolongación de la semivida *in vivo*.

Introducción: Para comprobar que la actividad del par diana CD79b/CD22 identificada en el complejo de exploración anclado heterodiméricamente Fab-Kd-Fab podía traducirse en una actividad similar deseada en un formato terapéutico unido molecularmente con un anti-albúmina dirigido a prolongar la semivida *in vivo*, se fusionó un fragmento de anticuerpo anti-albúmina a la cadena ligera del Fab para el antígeno CD22 del formato BYbe descrito en el ejemplo 8 por medio de un enlazador que tenía la secuencia SGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17). Se generaron especificidad por el antígeno CD79b (VR4447) y especificidad por el antígeno CD22 (VR4130 y VR4126) en un formato BYbe con y sin la adición de un fragmento anti-albúmina (VR0645).

Descripción de las construcciones usadas en este experimento.

Nombre de la construcción	Especificidad del Fab	scFv de cadena pesada	scFv de cadena ligera
BYbe VR4447/VR4126	Antígeno CD79b	Antígen o CD22	Ninguno
BYbe VR4447/VR4126/VR645) Albúmina	Antígeno CD79b	Antígen o CD22	Albúmina
BYbe VR4447/VR4130	Antígeno CD79b	Antígen o CD22	Ninguno
BYbe VR4447/VR4130/VR645) Albúmina	Antígeno CD79b	Antígen o CD22	Albúmina

Métodos

Purificación de BYbe con/sin especificidad adicional anti-albúmina

Los formatos BYbe (Fab-dsscFv [scFv del extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab]) y BYbe con anti-
5 albúmina (Fab-2xdsscFv [scFv del extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera de Fab]) se purificaron del siguiente modo. Los sobrenadantes de cultivo celular de la expresión convencional en expiHEK o CHO se esterilizaron por filtración de 0.22 µm. Los sobrenadantes filtrados se
10 cargaron a razón de 2 ml/min en columnas de 50 ml GammabindPlus Sepharose XK26 (GE Healthcare) equilibradas en PBS a pH7.4 (Sigma Aldrich Chemicals). Después de cargarlas, se lavaron las columnas con PBS a pH7.4 y después se eluyeron con glicina 0.1M/HCl a pH 2.7. Se
15 efectuó un seguimiento de la elución por absorbancia a 280nm, se recogió el pico de elución y después se neutralizó con 1/25° del volumen de Tris 2 M/HCl a pH8.5. Las muestras neutralizadas se concentraron usando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana con un
20 corte de peso molecular de 10 kDa o 30 kDa y centrifugación a 4000 xg en un rotor basculante. Las muestras concentradas se aplicaron a una columna XK16/60 o XK26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS, pH7.4. Las columnas se revelaron con un gradiente isocrático de PBS, pH7.4 a 1
25 ml/min o 2.6 ml/min, respectivamente. Las fracciones se recogieron y analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5 µm, de 7.8 X 300mm revelada con un gradiente isocrático de fosfato 0.2 M, pH 7.0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280
30 nm. Las fracciones de monómero seleccionadas se agruparon y concentraron a >1 mg/ml usando un concentrador Amicon

Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa o 30 kDa y centrifugación a 4000 xg en un rotor basculante. Se ensayaron las muestras finales; respecto de su concentración mediante un espectrofotómetro de UV visible de barrido de A280 (Cary 50Bio); respecto del % de monómero mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5 µm, de 7.8x300 mm revelada con un gradiente isocrático de fosfato 0.2 M, pH7.0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm; mediante un ciclo de SDS-PAGE reductora y no reductora en geles de 1.5 mm de Tris-Glicina al 4-20% (Novex) a 50 mA (por gel) durante 53 minutos; y respecto de endotoxinas mediante el sistema de ensayo portable EndoSafe® de Charles River con cartuchos de prueba de lisado de amebocito Limulus (LAL).

Se preincubaron 100 nM de cada construcción de proteína purificada con PBMC procedentes de cinco donantes individuales durante 60 min a 37°C/5% de CO₂ en medio RMPI 1640 más suero fetal bovino al 10% y Glutamax 2 mM (medio R10). Transcurridos 60 minutos, se estimularon las células con 25 ug/ml de un anticuerpo de cabra anti-IgM diseñado únicamente para estimular linfocitos B. 24 horas después, se colocaron las placas sobre hielo para detener la activación de células adicionales antes de lavar una vez con tampón para citometría de flujo enfriado en hielo (PBS + BSA al 1% + NaN₃ al 0.01%). Se retiró todo el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos celulares. Las células se colocaron sobre hielo y se añadió un cóctel de anticuerpos anti-CD19, -CD20, -CD27, -CD71 y CD86. Las células se incubaron durante 60 min antes de lavar dos veces en tampón para citometría de flujo. Los datos acerca de la unión de anti-CD27, -CD71 y CD86 a linfocitos B

positivos a CD19/CD20 se generaron usando un citómetro de flujo de alto rendimiento iQUE. Se empleó el programa informático Forecyt para generar histogramas y derivar las lecturas de media geométrica de la intensidad para la unión
5 de los anticuerpos anti-CD27, -CD71 y -CD86 a los linfocitos B. Estos datos se exportaron a Excel y se generaron los valores de porcentaje de inhibición para cada combinación. Después, se exportaron los datos a Graphpad Prism y se generaron diagramas de cajas y bigotes para cada
10 combinación, indicándose la media mediante un "+".

La figura 21 muestra la inhibición de la expresión de CD27 en linfocitos B inducida por BYbe VR4447/VR4126 y BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina. Entre los cinco donantes ensayados, ambas mostraron niveles consistentemente
15 similares de inhibición de CD27 inducido por anti-IgM. La figura 22 muestra la inhibición de la expresión de CD71 en linfocitos B inducida por BYbe VR4447/VR4126 y BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina. Entre los cinco donantes, ambas mostraron niveles consistentemente similares de
20 inhibición de CD71 inducido por anti-IgM. La figura 23 muestra la inhibición de la expresión de CD86 en linfocitos B inducida por BYbe VR4447/VR4126 y BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina. Entre los cinco donantes, ambas mostraron niveles consistentemente similares de
25 inhibición de CD86 inducido por anti-IgM.

La figura 24 muestra la inhibición de la expresión de CD27 en linfocitos B inducida por BYbe VR4447/VR4130 y BYbe VR4447/VR4130/VR645/Albúmina. Entre los cinco donantes ensayados, ambas mostraron niveles consistentemente
30 similares de inhibición de CD27 inducido por anti-IgM. La figura 25 muestra la inhibición de la expresión de CD71 en

linfocitos B inducida por BYbe VR4447/VR4130 y BYbe VR4447/VR4130/VR645/Albúmina. Entre los cinco donantes, ambas mostraron niveles consistentemente similares de inhibición de CD71 inducido por anti-IgM. La figura 26 muestra la inhibición de la expresión de CD86 en linfocitos B inducida por BYbe VR4447/VR4130 y BYbe VR4447/VR4130/VR645/Albúmina. Entre los cinco donantes, ambas mostraron niveles consistentemente similares de inhibición de CD86 inducido por anti-IgM.

Ejemplo 10 - Efecto del uso como diana conjunto del antígeno CD79b más el antígeno CD22 en la función de los linfocitos B de memoria usando BYbe biespecíficos unidos molecularmente con o sin la adición adicional de un anti-albúmina.

Introducción: Para evaluar si el uso como diana de CD79b/CD22 tiene un efecto funcional en los linfocitos B en cultivo a largo plazo, se midió la producción de IgG por linfocitos B cultivados en aislamiento o en un cultivo mixto con PBMC. La medida de los anticuerpos para el antígeno de recuerdo, toxoide tetánico, proporciona una lectura de la función de los linfocitos B de memoria.

Se generaron especificidad por el antígeno CD79b (VR4447) y especificidad por el antígeno CD22 (VR4126, VR4127 y VR4130) en un formato BYbe con o sin la adición de un fragmento anti-albúmina (VR0645). El fragmento de anticuerpo anti-albúmina se fusionó a la cadena ligera del Fab para el antígeno CD22 del formato BYbe, como se ha descrito en el ejemplo 8 por medio de un enlazador que tiene la secuencia SGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 17).

Descripción de las construcciones usadas en este experimento.

	Nombre de la construcción	Especificidad del Fab	sc Fv de cadena pesada	sc Fv de cadena ligera
5	BYbe VR4447/VR4126	Antígeno CD79b	Antígeno CD22	Ninguno
10	BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina	Antígeno CD79b	Antígeno CD22	Albúmina
	BYbe VR4447/VR4127	Antígeno CD79b	Antígeno CD22	Ninguno
15	BYbe VR4447/VR4130	Antígeno CD79b	Antígeno CD22	Ninguno
20	BYbe VR4447/VR4130/VR645/Albúmina	Antígeno CD79b	Antígeno CD22	Albúmina

Métodos

Purificación de BYbe con/sin especificidad adicional anti-albúmina

Los formatos BYbe (Fab-dsscFv [scFv del extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab]) y BYbe con anti-albúmina (Fab-2xdsscFv [scFv del extremo C-terminal de la cadena pesada y ligera de Fab]) se purificaron como se describe en el ejemplo 9.

Activación de linfocitos B y medida de IgG específicas para toxoide tetánico

Se estimularon PBMC o linfocitos B purificados procedentes de hasta 3 donantes separados con 500ng/ml de

CD40L, 1ug/ml de CpG y 50ng/ml de IL-21 en medio 1640 más suero bovino fetal al 10% y Glutamax 2 mM (medio R10) durante 6 días. Se añadieron construcciones de proteína purificada a una concentración final de 100nM en el día 0 y se mantuvieron en el medio de cultivo durante toda la duración del ensayo. Después de 6 días, se recogieron los sobrenadantes y se detectó la cantidad de IgG específicas para toxoide tetánico mediante ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de ELISA Maxisorp de medio pocillo (Nunc) con 10 ug/ml de toxoide tetánico en PBS durante una noche a 4°C. Después, se bloquearon las placas con leche al 5% en PBS que contenía Tween20 al 0.05% durante 2 horas. Se diluyeron los sobrenadantes y después se añadieron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS-Tween20 al 0.05% y se detectó el anticuerpo para el toxoide tetánico usando un anti-IgG humana (H+L) de cabra-peroxidasa diluido a 1 ug/ml en leche al 5%-PBS-Tween20 al 0.05%. Las placas se revelaron usando solución de sustrato TMB (KPL) y se midió la absorbancia a 450nm usando un lector de microplacas Synergy 2 (Biotek). Los datos se exportaron a Excel y se calculó el porcentaje de inhibición en relación con las células cultivadas sin anticuerpos de ensayo. Después, se exportaron los datos a Graphpad Prism® y se representaron como diagramas de barras.

La figura 27 muestra la inhibición de la producción de IgG para toxoide tetánico por PBMC cultivadas con BYbe VR4447/VR4126, BYbe VR4447/VR4127 y BYbe VR4447/VR4130. Los datos representan datos agrupados de 3 donantes.

La figura 28 muestra la inhibición de la producción de IgG para toxoide tetánico por linfocitos B purificados cultivados con BYbe VR4447/VR4126, BYbe VR4447/VR4127 y

BYbe VR4447/VR4130. Los datos representan datos agrupados de 2 donantes.

La figura 29 muestra la inhibición de la producción de IgG para toxoide tetánico por PBMC o linfocitos B purificados cultivados con BYbe VR4447/VR4126, BYbe VR4447/VR4127, BYbe VR4447/VR4130, BYbe VR4447/VR4126/VR645/Albúmina y BYbe VR4447/VR4130/VR645/Albúmina. Datos mostrados de un solo donante.

10 **Ejemplo 11 - Desregulación de la señalización de BCR en linfocitos B de paciente con SLE y el efecto del uso conjunto como diana del antígeno CD79b más el antígeno CD22 en la función de linfocitos B de SLE.**

Introducción: Para evaluar si podría usarse la combinación de CD79b/CD22 para tratar a personas con enfermedades autoinmunitarias, los presentes inventores usaron linfocitos B de pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE) como sistema modelo. Se probó el impacto de la combinación de CD79b/CD22 (VR4447/VR4130) en el estado de activación de las proteínas de señalización que se sabe que están implicadas en la función de los linfocitos B pero desreguladas en los pacientes con SLE en comparación con voluntarios sanos. En este experimento, se compararon los linfocitos B de 12 pacientes de SLE y de 12 voluntarios sanos respecto del efecto que tuvo el uso como diana conjunta de CD79b y CD22 en su estado de activación.

Métodos:

Ensayo PhosFlow: Todos los ensayos se llevaron a cabo usando 2×10^5 PBMC por pocillo.

30 En las muestras tratadas, se probó el BYbe específico para el antígeno CD79b y el antígeno CD22 a una

concentración de 100 nM. Se preincubaron PBMC tanto de voluntarios sanos como de pacientes con SLE con BYbe durante 90 minutos a 37⁰C. En las muestras no tratadas, simplemente se omitió el BYbe durante este periodo de incubación. Transcurrido este tiempo, se activaron las células mediante la adición de 25 µg/mL de F(ab')₂ de cabra anti-IgM humana (Southern Biotechnology) durante 10 minutos a 37⁰C más un 5% de CO₂ y se detuvo la reacción mediante la adición de fijativo (Cytofix - BD Biosciences). En las muestras no estimuladas, simplemente se omitió el anti-IgM humana durante este periodo de incubación. Transcurridos 15 minutos a temperatura ambiente, se sedimentaron las células (500 xg durante 5 min) y después se resuspendieron en tampón Perm III (BD Biosciences) enfriado en hielo antes de lavarlas dos veces en tampón de flujo (PBS + BSA al 1% + NaN₃ al 0.01% + EDTA 2 mM). Después, se tiñeron las células con anti-CD20, anti-NF-κB fosforilado (p), anti-pSyk, anti-pAkt y anti-pErk1 y 2 y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante una hora. Finalmente, se lavaron dos veces las placas en tampón de flujo antes de medirlas en un citómetro de flujo iQUE (Intellicyt). Después se calculó la media geométrica (intensidad media de fluorescencia, MFI) de la expresión de pNF-κB, pSyk, pAkt y pErk1 y 2 en linfocitos B y se expresó de manera gráfica.

Resultados:

La figura 30 muestra que la fosforilación basal de NF-κB, Syk, Akt y Erk1 y 2 (sin estimular y sin tratar) es elevada en linfocitos B de pacientes de SLE en comparación con aquellos de voluntarios sanos.

Las figuras 31 a 34 muestran que el BYbe para CD79/CD22 puede inhibir igualmente a pNF- κ B, pSyk, pAkt y pErk1 y 2 en voluntarios sanos y pacientes de SLE.

Conclusiones:

5 Estos datos demuestran que los linfocitos B de pacientes de SLE se activan antes de cualquier estimulación *in vitro* en comparación con voluntarios sanos. Tras la estimulación de las células a través del receptor de linfocitos B, tanto los voluntarios sanos como los
10 pacientes de SLE muestran niveles potenciados de activación en comparación con la señal de fondo. Tanto en los voluntarios sanos como en los pacientes de SLE esta señal se bloquea sustancialmente mediante la combinación de CD79b/CD22. Estos datos indican que la combinación de
15 CD79b/CD22 puede inhibir a los linfocitos B tanto de voluntarios sanos como de personas con una enfermedad autoinmunitaria subyacente, lo que indica que esta vía tiene una importancia fundamental para la activación de los linfocitos B.

20 Ejemplo 12 - Método de humanización

Se diseñaron versiones humanizadas de los anticuerpos de conejo obtenidos en los ejemplos anteriores y proporcionados en la figura 35 injertando las CDR de las regiones V de anticuerpo de conejo en armazones de región V
25 de anticuerpo de línea germinal humana. Para mejorar las probabilidades de recuperar la actividad del anticuerpo, también se conservó una serie de restos del armazón de las regiones V de conejo en las secuencias humanas diseñadas. Estos restos se seleccionaron usando el protocolo explicado
30 por Adair *et al.* (1991) (Humanised antibodies. documento WO91/09967). Las CDR injertadas de la secuencia donante a

la aceptora son como se definen por Kabat (Kabat et al., 1987), con la excepción de la CDRH1 donde se emplea la definición combinada de Chothia/Kabat (véase Adair et al., 1991 Humanised antibodies. documento WO91/09967).

5 Normalmente, los genes de VH de anticuerpos de conejo son más cortos que los genes aceptores de VH humanos. Cuando se alinean con las secuencias aceptoras humanas, el armazón 1 de las regiones VH de los anticuerpos de conejo normalmente carece del resto N-terminal, que se conserva en el

10 anticuerpo humanizado. El armazón 3 de las regiones VH de anticuerpo de conejo también carece normalmente de uno o dos restos (75 o 75 y 76) en el bucle entre las hebras de beta lámina D y E: en los anticuerpos humanizados, se rellena el hueco con los restos correspondientes de la

15 secuencia aceptora humana seleccionada.

Las secuencias humanizadas se proporcionan en la figura 35 y los restos donantes se indican en negrita y subrayado. También se proporcionan secuencias variantes de CDR.

20 **Anticuerpo para CD79 Ab 4447**

Se seleccionó la región V humana IGKV1D-13 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4447. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes

25 restos de armazón del gen VK de 4447 (restos donantes) en las posiciones 2, 3, 36, 46, 49 y 70 (numeración de Kabat): Glutamina (Q2), Valina (V3), Leucina (L36), Glutamina (Q46), Histidina (H49) y Glutamina (Q70), respectivamente.

Se seleccionó la región V humana IGHV3-48 más la

30 región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4447. Además

de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen de VH de 4447 (restos donantes) en las posiciones 24, 48, 49, 71, 73 y 78 (numeración de Kabat): Valina (V24), Isoleucina (I48), Glicina (G49),
5 Lisina (K71), Serina (S73) y Valina (V78), respectivamente.

Se seleccionó la región V humana IGHV4-59 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4447. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de
10 los siguientes restos de armazón del gen VH de 4447 (restos donantes) en las posiciones 37, 67, 71, 73 y 78 (numeración de Kabat): Valina (V37), Fenilalanina (F67), Lisina (K71), Serina (S73) y Valina (V78), respectivamente. El resto de glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó
15 por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo: se ha comunicado ampliamente la conversión de Glutamina a piroglutamina en el extremo N-terminal de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. En algunos casos, puede mutarse la CDRL3 para
20 eliminar un par de restos de cisteína (variante de CDRL3).

Anticuerpo para CD79 Ab 4450

Se seleccionó la región V humana IGKV1-6 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4450. Además de las CDR,
25 pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VK de 4450 (restos donantes) en las posiciones 3 y 70 (numeración de Kabat): Ácido aspártico (D3) y Glutamina (Q70), respectivamente. En algunos casos, puede mutarse la CDRL3 para modificar un sitio potencial de
30 isomerización de aspartato (variantes 1-3 de CDRL3).

Se seleccionó la región V humana IGHV3-66 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4450. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes
5 restos de armazón del gen VH de 4450 (restos donantes) en las posiciones 24, 48, 49, 73 y 78 (numeración de Kabat): Valina (V24), Isoleucina (I48), Glicina (G49), Serina (S73) y Valina (V78), respectivamente.

Se seleccionó la región V humana IGHV4-59 más la
10 región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4450. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4450 (restos donantes) en las posiciones 37, 67, 71, 73 y 78 (numeración
15 de Kabat): Valina (V37), Fenilalanina (F67), Valina (V71), Serina (S73) y Valina (V78), respectivamente. El resto de Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo.

20 **Anticuerpo para CD22 Ab 4120**

Se seleccionó la región V humana IGKV1D-13 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4120. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes
25 restos de armazón del gen VK de 4120 (restos donantes) en las posiciones 2 y 3 (numeración de Kabat): Fenilalanina (F2) y Ácido glutámico (E3), respectivamente.

Se seleccionó la región V humana IGHV3-33 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora
30 para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4120. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes

restos de armazón del gen VH de 4120 (restos donantes) en las posiciones 11, 48, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Leucina (L11), Isoleucina (I48), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78),
5 respectivamente. El resto de Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1 y la CDRH2 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y
10 variante de CDRH2, respectivamente).

Se seleccionó la región V humana IGHV4-38-2 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4120. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de
15 los siguientes restos de armazón del gen VH de 4120 (restos donantes) en las posiciones 24, 37, 49, 67, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Alanina (A24), Valina (V37), Alanina (A49), Fenilalanina (F67), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. El resto de
20 Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1 y la CDRH2 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y variante de CDRH2,
25 respectivamente).

Anticuerpo para CD22 Ab 4126

Se seleccionó la región V humana IGKV1-5 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4126. Además de las CDR,
30 pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VK de 4126 (restos donantes) en las

posiciones 3 y 70 (numeración de Kabat): Valina (V3) y Glutamina (Q70), respectivamente.

Se seleccionó la región V humana IGHV3-7 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4126. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4126 (restos donantes) en las posiciones 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y variante de CDRH2 y CDRH3, respectivamente).

Se seleccionó la región V humana IGHV4-4 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4126. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4126 (restos donantes) en las posiciones 24, 48, 49, 67, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Alanina (A24), Valina (V48), Alanina (A49), Fenilalanina (F67), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. El resto de Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1, la CDRH2 y la CDRH3 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y variante de CDRH2 y CDRH3, respectivamente).

Anticuerpo para CD22 Ab 4127

Se seleccionó la región V humana IGKV1-5 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las

CDR de cadena ligera del anticuerpo 4127. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VK de 4127 (restos donantes) en las posiciones 1, 3 y 70 (numeración de Kabat): Alanina (A1),
5 Valina (V3) y Glutamina (Q70), respectivamente. En algunos casos, puede mutarse la CDRL3 para modificar sitios potenciales de isomerización de aspartato (variantes 1-15 de CDRL3).

Se seleccionó la región V humana IGHV3-9 más la región
10 J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4127. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4127 (restos donantes) en las posiciones 47, 48, 49, 71, 73, 76, 78 y 94 (numeración de
15 Kabat): Leucina (L47), Isoleucina (I48), Glicina (G49), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76), Valina (V78) y Arginina (R94), respectivamente. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1 y la CDRH2 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y variante de CDRH2,
20 respectivamente).

Se seleccionó la región V humana IGHV4-38-2 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4127. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de
25 los siguientes restos de armazón del gen VH de 4127 (restos donantes) en las posiciones 24, 37, 47, 67, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Alanina (A24), Valina (V37), Leucina (L47), Fenilalanina (F67), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. El resto de
30 Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y

purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1 y la CDRH2 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y variante de CDRH2, respectivamente).

5 **Anticuerpo para CD22 Ab 4128**

Se seleccionó la región V humana IGKV1-5 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4128. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de
10 armazón del gen VK de 4128 (restos donantes) en las posiciones 3, 36, 63, 65, 66 y 71 (numeración de Kabat): Valina (V3), Fenilalanina (F36), Lisina (K63), Ácido aspártico (D65), Arginina (R66) y Tirosina (Y71), respectivamente.

15 Se seleccionó la región V humana IGHV3-33 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4128. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4128 (restos donantes) en
20 las posiciones 11, 23, 24, 48, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Leucina (L11), Lisina (K23), Glicina (G24), Isoleucina (I48), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. El resto de Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido
25 glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1 y la CDRH2 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y variante de CDRH2, respectivamente).

30 Se seleccionó la región V humana IGHV4-59 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo

4128. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4128 (restos donantes) en las posiciones 23, 24, 37, 49, 67, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Lisina (K23), Glicina (G24), Valina (V37), Alanina (A49), Fenilalanina (F67), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. El resto de Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, pueden mutarse la CDRH1 y la CDRH2 para eliminar restos de Cisteína (variante de CDRH1 y variante de CDRH2, respectivamente).

Anticuerpo para CD22 Ab 4130

Se seleccionó la región V humana IGKV1-9 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4130. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VK de 4130 (restos donantes) en las posiciones 1, 2 y 3 (numeración de Kabat): Alanina (A1), Alanina (A2) y Valina (V3), respectivamente.

Se seleccionó la región V humana IGHV3-66 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4130. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4130 (restos donantes) en las posiciones 48, 49, 67, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Isoleucina (I48), Glicina (G49), Valina (V67), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. En algunos casos, puede mutarse la CDRH2 para eliminar un resto de Cisteína y/o modificar un sitio potencial de desamidación de Asparagina (variantes 1-5 de

CDRH2). También puede mutarse la CDRH3 para modificar un sitio potencial de desamidación de Asparagina (variantes 1-2 de CDRH3).

Se seleccionó la región V humana IGHV4-4 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4130. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4130 (restos donantes) en las posiciones 24, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Alanina (A24), Lisina (K71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. El resto de Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, puede mutarse la CDRH2 para eliminar un resto de Cisteína y/o modificar un sitio potencial de desamidación de Asparagina (variantes 1-5 de CDRH2). También puede mutarse la CDRH3 para modificar un sitio potencial de desamidación de Asparagina (variantes 1-2 de CDRH3).

20 **Anticuerpo para CD22 Ab 4132**

Se seleccionó la región V humana IGKV1-5 más la región J JK4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4132. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VK de 4132 (restos donantes) en las posiciones 3 y 71 (numeración de Kabat): Valina (V3) y Tirosina (Y71), respectivamente.

Se seleccionó la región V humana IGHV3-21 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4132. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes

restos de armazón del gen VH de 4132 (restos donantes) en las posiciones 48, 49, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Serina (S48), Glicina (G49), Asparagina (N71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78),
5 respectivamente. En algunos casos, puede mutarse la CDRH1 para eliminar un resto de cisteína (variante de CDRH1). También puede mutarse la CDRH2 para eliminar un resto de Cisteína y/o modificar un sitio potencial de desamidación de Asparagina (variantes 1-5 de CDRH2).

10 Se seleccionó la región V humana IGHV4-4 más la región J JH4 (IMGT, <http://www.imgt.org/>) como aceptora alternativa para las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4132. Además de las CDR, pueden conservarse uno o más de los siguientes restos de armazón del gen VH de 4132 (restos
15 donantes) en las posiciones 24, 48, 67, 71, 73, 76 y 78 (numeración de Kabat): Alanina (A24), Serina (S48), Fenilalanina (F67), Asparagina (N71), Serina (S73), Treonina (T76) y Valina (V78), respectivamente. El resto de Glutamina en la posición 1 del armazón humano se reemplazó
20 por Ácido glutámico (E1) para posibilitar la expresión y purificación de un producto homogéneo. En algunos casos, puede mutarse la CDRH1 para eliminar un resto de cisteína (variante de CDRH1). También puede mutarse la CDRH2 para eliminar un resto de Cisteína y/o modificar un sitio
25 potencial de desamidación de Asparagina (variantes 1-5 de CDRH2).

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la
30 presente descripción de la invención.