MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO BIESPECÍFICAS ACTIVADORAS DE CÉLULAS T QUE SE UNEN A CD3 Y AL RECEPTOR 1 DE FOLATO (FOLR1)

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha remitido por vía electrónica en formato ASCII y se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 9 de noviembre de 2015, se denomina 32186_SL.txt y tiene 445.570 bytes de tamaño.

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a moléculas de unión a antígeno biespecíficas para activar células T, en particular, a anticuerpos biespecíficos que se dirigen a CD3 y al receptor 1 de folato (FolR1). Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas, y a vectores y células hospedadoras que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a métodos para producir las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención, y a métodos para usar estas moléculas de unión a antígeno biespecíficas en el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

La destrucción selectiva de una célula individual o de un tipo celular específico a menudo es deseable en una diversidad de situaciones clínicas. Por ejemplo, la destrucción específica de células tumorales es una meta principal de la terapia para el cáncer, a la vez que se dejan las células y tejidos sanos intactos y sin dañar.

Una forma atractiva de lograr eso es mediante la inducción de una respuesta inmunitaria contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunitarias, tales como los linfocitos citolíticos naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL) ataquen y destruyan a células tumorales. Los CTL forman las células efectoras más potentes del sistema inmunitario, aunque no pueden activarse mediante el mecanismo efector mediado por el dominio Fc de los anticuerpos terapéuticos convencionales.

En este sentido, los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un "brazo" a un antígeno de superficie en células diana, y con el segundo "brazo" a un componente activador invariante del complejo de receptor de células T (TCR), ha captado el interés en los últimos años. La unión simultánea de dicho anticuerpo a ambas de sus dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y la célula T, causando la activación de cualquier célula T citotóxica y la posterior lisis de

la célula diana. De este modo, se redirige la respuesta inmunitaria a las células y es independiente de la presentación de antígenos peptídicos por la célula diana o de la especificidad de las células T como pudiera ser relevante para la activación normal restringida al CMH de los CTL. En este contexto es crucial que los CTL solo se activen cuando una célula diana está presentado al anticuerpo biespecífico a estos, es decir, se imita la sinapsis inmunológica. Son particularmente deseables anticuerpos biespecíficos que no requieran de preacondicionamiento o coestimulación de linfocitos para provocar una lisis eficaz de células diana.

FOLR1 se expresa en células tumorales epiteliales de diversos orígenes, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, Se han descrito varias estrategias para dirigirse a FOLR1 con anticuerpos terapéuticos, tales como farletuzumab, conjugados de anticuerpo-fármaco o terapia con células T adoptivas para la obtención de imágenes de tumores (Kandalaft et al., J Transl Med. 3 ago 2012;10:157. doi: 10.1186/1479-5876-10-157; van Dam et al., Nat Med. 18 sep 2011;17(10):1315-9. doi: 10.1038/nm.2472; Cliftonet al., Hum Vaccin. feb 2011;7(2):183-90. Epub 1 Feb 2011; Kelemen et al., Int J Cancer. 15 de jul de 2006;119(2):243-50; Vaitilingam et al., J Nucl Med. jul 2012;53(7); Teng et al., Ago 2012;9(8):901-8. doi: 10.1517/17425247.2012.694863. Epub 5 jun 2012. Se han efectuado algunos intentos para dirigirse a tumores positivos a receptor de folato con construcciones que se dirigen al receptor de folato y a CD3 (Kranz et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 26 de sep, 1995; 92(20): 9057–9061; Roy et al., Adv Drug Deliv Rev. 29 abr 2004;56(8):1219-31; Huiting Cui et al Biol Chem. 17 ago; 2012; 287(34): 28206-28214; Lamers et al., Int. J. Cancer. 60(4):450 (1995); Thompson et al., MAbs. 2009 Jul-Aug;1(4):348-56. Epub 19 jul 2009; Mezzanzanca et al., Int. J. Cancer, 41, 609-615 (1988). Sin embargo, las estrategias abordadas hasta ahora tienen muchas desventajas. Las moléculas usadas hasta ahora no podían producirse de manera fácil y fiable ya que requieren reticulación química. De manera similar, no pueden producirse moléculas híbridas a gran escala como proteínas humanas y requieren el uso de proteínas de rata, murinas u otras que son altamente inmunogénicas cuando se administran a seres humanos y, por lo tanto, tienen un valor terapéutico limitado. Además, muchas de las moléculas existentes retienen la unión a FcgR.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de nuevos anticuerpos biespecíficos mejorados para inmunoterapia dirigida mediada por células T. La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas diseñadas para la activación dirigida de células T, en particular, moléculas de unión a antígeno biespecíficas adecuadas como agentes terapéuticos eficaces y seguros que pueden producirse y dosificarse fácilmente.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34; y

(ii) un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1).

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende un primer resto de unión a antígeno que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende además (iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1. En una realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores, al menos uno del segundo y tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores, comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de manera estable. En algunas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno y el segundo resto de unión a antígeno están conectados cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En algunas realizaciones, el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, opcionalmente a través de un enlazador peptídico.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende al menos una

secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En otra realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende al menos una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 50 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende (a) secuencias de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) de SEC ID Nº: 8; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de SEC ID Nº: 9; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de SEC ID Nº: 50; (d) una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) de SEC ID Nº: 52; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de SEC ID Nº: 53, y (f) una secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de SEC ID Nº: 54. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 51.

En otra realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende al menos una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 275 y SEC ID Nº: 315 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende (a) secuencias de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) de SEC ID Nº: 16; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de SEC ID Nº: 275; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de SEC ID Nº: 315; (d) una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) de SEC ID Nº: 32; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de SEC ID Nº: 33, y (f) una secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de SEC ID Nº: 34. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse de manera específica a

FolR1 comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 de ser humano y a FolR1 de mono cinomolgo. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano, a FolR1 de mono cinomolgo y a FolR1 murino. En una realización, molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano, a FolR1 de cinomolgo y no a FolR1 murino.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada en la que bien las regiones variables o las constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores comprende no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3. En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina. En una realización, el dominio Fc es una inmunoglobulina de clase IgG, específicamente un dominio Fc de IgG_1 o IgG_4. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor, generando de este modo una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que puede posicionarse en una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que puede posicionarse la protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad. En una realización, el dominio Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc y/o la función

efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo. En una realización, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc activador y/o la función efectora, siendo dichas sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de Kabat). En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ, En una realización, la función efectora es citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la proliferación de células T humanas positivas a CD3 *in vitro*. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células mononucleares de sangre periférica humanas *in vitro*. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro*. En una realización, la célula T es una célula T CD8 positiva. En una realización, la célula tumoral humana que expresa FolR1 es una célula HeLa, Skov-3, HT-29, o HRCEpiC. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 36 pM tras 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 178,4 pM tras 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 134,5 pM o mayor tras 48 horas.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores induce la regulación positiva de la expresión de la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 sobre la célula T según se mide mediante citometría de flujo. En una realización, la célula T es una célula T CD4 positiva o una célula T CD8 positiva. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 5,36 pM a aproximadamente 4 nM. En una realización, la

molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 murino con una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores es específica para FolR1 y no se une a FolR2 o FolR3. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores tiene una afinidad (unión monovalente) de 1 µM o mayor. En una realización, la afinidad es de aproximadamente 1,4 µM para FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores tiene una avidez (unión bivalente) de aproximadamente 1-100 nM o menor. En una realización, la avidez es de aproximadamente 10 nM o menor. En una realización, la avidez es de 10 nM.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a FolR1 expresado en una célula tumoral humana. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a un epítopo conformacional en FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células de cualquiera de las realizaciones anteriores T no se une al receptor de folato 2 humano (FolR2) o al receptor de folato 3 humano (FolR3). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEC ID Nº: 227). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 227, 230 y 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 y 229.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que compite por la unión a FolR1 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 49 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 51; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con

un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que compite por la unión a FolR1 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3, y un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1), en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en FolR1 humano que un primer anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 49 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 51; y en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en CD3 humano que un segundo anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3, y un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1), en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en FolR1 humano que un primer anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEC ID Nº: 31; y en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en CD3 humano que un segundo anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEC ID Nº: 31.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a FolR1 con un anticuerpo que

comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, en la que la molécula de unión a antígeno comprende una primera, segunda, tercera, cuarta y quinta cadena polipeptídica que forman un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, en el que el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse a CD3 y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son cada uno capaces de unirse al receptor 1 de folato (FolR1), en el que a) la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden, en dirección de amino (N)-terminal a carboxilo (C)-terminal, VLD1 y CLD1; b) la tercera cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, VLD2 y CH1D2; c) la cuarta cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, VHD1, CH1D1, CH2D1 y CH3D1; d) la quinta cadena polipeptídica comprende VHD1, CH1D1, VHD2, CLD2, CH2D2 y CH3D2; en el que VLD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VLD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, CLD1 es un primer dominio constante de cadena ligera, CLD2 es un segundo dominio constante de cadena ligera, VHD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VHD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, CH1D1 es un primer dominio constante 1 de cadena pesada, CH1D2 es un segundo dominio constante 1 de cadena pesada, CH2D1 es un primer dominio constante 2 de cadena pesada, CH2D2 es un segundo dominio constante 2 de cadena pesada, CH3D1 es un primer dominio constante 3 de cadena pesada, y CH3D2 es un segundo dominio constante 3 de cadena pesada.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, (i) la tercera cadena polipeptídica y VHD2 y CLD2 de la quinta cadena polipeptídica forman el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3; (ii) la primera cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la cuarta cadena polipeptídica forman el segundo resto de unión capaz de unirse a FolR1; y (iii) la segunda cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la quinta cadena polipeptídica forman el tercer resto de unión capaz de unirse a FolR1. En una realización, CH2D1, CH3D1, CH2D2 y CH3D2 forman un dominio Fc de una inmunoglobulina de clase IgG. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En una realización, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización, CH3D2 comprende un resto de aminoácido que tiene un volumen mayor de cadena lateral, que se puede posicionar en una cavidad en CH3D1. En una realización, el dominio Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo. En una

realización, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen al menos una de unión a un receptor de Fc activador y función efectora, siendo dichas sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G de acuerdo con la numeración de Kabat. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ, En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la proliferación de células T humanas positivas a CD3 *in vitro*. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células mononucleares de sangre periférica humanas *in vitro*. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro*. En una realización similar, la célula tumoral humana que expresa FolR1 es una célula HeLa, Skov-3, HT-29, o HRCEpiC. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación mediada por células T de la célula tumoral que expresa FolR1 *in vitro* con una CE40 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 36 pM después de 24 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 178,4 pM después de 24 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 134,5 pM o mayor después de 48 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la regulación positiva de la expresión de la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 sobre la célula T según se mide mediante citometría de flujo. En una realización similar, la célula T es una célula T CD4 positiva o una célula T CD8 positiva. En una de las realizaciones anteriores, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 5,36 pM a aproximadamente 4 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 murino con

una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 expresado en una célula tumoral humana. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a un epítopo conformacional en FolR1 humano. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T no se une al receptor de folato 2 humano (FolR2) o al receptor de folato 3 humano (FolR3). En una de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEC ID Nº: 227). En una de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 227, 230 y 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 y 229. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es una molécula humanizada o quimérica. En una de las realizaciones anteriores, VHD2 y CH1D1 están enlazadas a través de un enlazador peptídico.

En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 86. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la quinta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230; la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 86; la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309; y la quinta cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno

biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la realización anterior comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230 y de SEC ID Nº: 86.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 276. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la realización anterior comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 277 y de SEC ID Nº: 35.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 277. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 276.

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 169. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 246. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 247. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 97. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 198.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 287. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia

nucleotídica de SEC ID Nº: 288. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 289.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido de la realización anterior. En otro aspecto, la invención proporciona un vector, particularmente un vector de expresión, que comprende al polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento. En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido o un vector de cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento.

En un aspecto, la invención proporciona un método para producir la molécula de unión a antígeno biespecífico activadora de células T capaz de unirse específicamente a CD3 y a un antígeno de célula diana, que comprende las etapas de a) cultivar la célula hospedadora de las realizaciones anteriores en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T y b) recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T producida mediante el método de la realización anterior.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la invención proporciona la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores o la composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso como medicamento.

En un aspecto, la invención proporciona la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores o la composición farmacéutica de una cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En un aspecto, la invención proporciona el uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores en una forma farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, dicha enfermedad es un cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana que comprende poner en contacto una célula diana con la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores en presencia de una célula T.

En un aspecto, la invención proporciona la invención tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-I ilustran configuraciones ejemplares de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T (TCB) de la invención. Todas las construcciones, a excepción del formato kappa-lambda en (Fig. 1I) tienen mutaciones P329G LALA y comprenden fragmentos Fc de pomo en agujero con modificaciones de pomo en agujero. (Fig. 1A) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 invertido (cadena ligera común)”. La molécula de unión a FolR1 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. Estas construcciones no se cruzan y tienen tres veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1 B) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 de cabeza a cola (cadena ligera común)”. Estas construcciones no se cruzan y tienen dos veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1C) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 clásico (cadena ligera común)”. Estas construcciones no se cruzan y tienen dos veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1D) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 clásico (cadena ligera común)”. La molécula de unión a CD3 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. Estas construcciones no se cruzan y tienen tres veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1E) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 crossfab clásico”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en vez de la cadena CH1-VH convencional. La molécula de unión a CD3 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. (Fig. 1F) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 crossfab invertido”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en

vez de la cadena CH1-VH convencional. La molécula de unión a FolR1 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. (Fig. 1G) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 crossfab cabeza a cola”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en vez de la cadena CH1-VH convencional. (Fig. 1H) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 crossfab clásico”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en vez de la cadena CH1-VH convencional. La figura 1I ilustra el formato de anticuerpo CD3/FolR1 kappa-lambda. Estas construcciones comprenden una cadena ligera común cruzada VLCH1 y una cadena cruzada VHCL específica para CD3 y una cadena cruzada VHCL específica para FolR1.

Las figuras 2A-C ilustran gráficas que resumen la unión de moléculas de IgG de unión a FoLR1 a células HeLa. La unión de moléculas de unión a FolR1 recientemente generadas a FolR1 expresado en células HeLa se determinó mediante citometría de flujo. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 3A-B ilustran gráficas que resumen la especificidad de las moléculas de unión a FolR1 por FolR1. Se analizó la unión de IgG de FolR1 a células HEK transfectadas de manera transitoria con FolR1 o FolR2 mediante citometría de flujo para identificar clones que se unen específicamente a FolR1 y no a FolR2. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 4A-B ilustran gráficas que resumen la reactividad cruzada de moléculas de unión a FolR1 a cyFoLR1. Se abordó la reactividad cruzada de los anticuerpos de FolR1 a FolR1 de cino en células HEK transfectadas de manera transitoria con cyFolR1 mediante citometría de flujo. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

La figura 5 representa a una gráfica que ilustra la internalización de TCB de FolR1 después de la unión. Se ensayó la unión de los cuatro TCB de FolR1 después de la unión a FolR1 en células HeLa. Los demás TCB de FolR1 sobre la superficie se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente después de los puntos temporales de incubación indicados a 37 °C. Se calculó el porcentaje de internalización.

Las figuras 6A-E ilustran gráficas que resumen la unión de IgG de FolR1 a células con diferentes niveles de expresión de FolR1. La unión de IgG de 16D5 y Mov19 a células tumorales con diferentes niveles de expresión de FolR1 se analizó mediante

citometría de flujo. Se incluyó IgG de DP47 como control de isotipo y se incluyó MKN-45 como línea celular negativa a FolR1. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 7A-L ilustran gráficas que resumen la eliminación de células HT-29 y SKOV3 mediada por células T. Se usaron TCB de FolR1 para ensayar la eliminación de células tumorales HT-29 y SKOV3 mediada por células T y la regulación positiva del marcador de activación en células T tras la eliminación. (Figs. 7A-D) Se midió la eliminación de células HT-29 y SKOV3 mediada por células T en presencia de TCB de FolR1 16D5 por liberación de LDH tras 24 h y 48 h. Se incluyó TCB DP47 como control negativo. Después de 48 h de incubación se evaluó la regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T CD8 y células T CD4 tras la eliminación de células tumorales SKOV3 (Figs. 7E-H) o HT-29 (Fig. 7I-L) mediante citometría de flujo.

La figura 8 ilustra una gráfica que muestra la ausencia de unión de anti-FolR1 a eritrocitos. Los eritrocitos se clasificaron como población positiva a CD235a y la unión de IgG 16D5, IgG Mov19 e IgG DP47 a esta población se determinó mediante citometría de flujo. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 9A-D ilustran gráficas que resumen la regulación positiva del marcador de activación en sangre completa. La regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 de células T CD4 y células T CD8 24 h después de la adición de TCB de FolR1 16D5, TCB de FolR1 Mov19 y TCB DP47 se analizó mediante citometría de flujo

Las figuras 12A-X ilustran gráficas que resumen la eliminación mediada por células T de células epiteliales primarias. Se usaron células epiteliales primarias con niveles muy bajos de FolR1 para ensayar la eliminación mediada por células T con TCB 16D4 de FolR1, se incluyó TCB de DP47 como control negativo y se incluyeron células HT29 como control positivo. (Figs. 12A-H) la liberación de LDH de células de pigmento retinal humano (HRP), corticales renales humanas (HRC), bronquiales humanas (HB) y HT29 se determinó tras 24 y 48 h. La regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T CD4 y células T CD8 tras la eliminación de (Figs. 12I-L) HRP, (Figs. 12M-P) HRC, (Figs. 12Q-T) HB y (Figs. 12 U-X) HT29 se determinó tras 48 h mediante citometría de flujo.

Las figuras 13A-C muestran una comparación de diferentes formatos de TCB con 16D5. Se comparó en cuatro formatos diferentes de TCB que contenían la molécula de unión a FolR1 16D5 en la Fig. 13A la unión a células HeLa, en la Fig, 13B la

eliminación mediada por células T de células SKOV3 tras 24 h y 48 h y en la Fig. 13C la regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T CD4 y células T CD8 48 h después de la eliminación.

La figura 15 ilustra un perfil FC de TCB de FolR1 en ratones NOG para tres dosis diferentes.

La figura 16 ilustra un protocolo experimental para el estudio de la eficacia con TCB de FolR1.

Las figuras 17A-B ilustran curvas de crecimiento tumoral. (Fig. 17A) Valores medios y EEM de volúmenes tumorales en los diferentes grupos de tratamiento. (Fig. 17B) Crecimiento tumoral de ratones individuales en todos los grupos de tratamiento. La ICT (inhibición del crecimiento tumoral) proporciona el porcentaje del volumen tumoral medio en comparación con el grupo de vehículo.

La figura 18 muestra los pesos tumorales a la finalización del estudio.

Las figuras 19A-B muestran análisis FACS de células T que se infiltran en tumores en el día 32. (Fig. 19A) Las suspensiones de células tumorales individuales se tiñeron con anti-CD3/CD4/CD8 humano y se analizaron mediante citometría de flujo. (Fig. 19B) Valores medios y EEM de los recuentos de células T por mg de tejido tumoral en diferentes grupos de tratamiento.

Las figuras 20A-B muestran análisis FACS para la activación de células T/desgranulación y secreción de citocinas en el día 32 del estudio. Se tiñeron células T CD4+ (Fig. 20A) y CD8+ (Fig. 20B) que se infiltran en tumores para citocinas, activación y marcadores de desgranulación. Se muestran los valores medios y EEM de los recuentos de células T por mg de tejido tumoral en diferentes grupos de tratamiento.

Las figuras 21A-B muestran el porcentaje de lisis tumoral. Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Tras 24 h (Fig. 21A) y 48 h (Fig. 21B) se determinó la eliminación de células tumorales midiendo la liberación de LDH.

Las figuras 22A-D muestran la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD4. Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Después de 48 h, se midió la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD4 (Fig. 22A-B) y en células T CD8 (Fig. 22C-D) mediante citometría de flujo.

Las figuras 23A-B muestran el porcentaje de lisis tumoral. Eliminación mediada por células T de células SKOV-3 (FolR1 medio) inducida por TBC 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5 tras 24 h (Fig. 23A) y 48 h (Fig. 23B) de incubación (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras).

Las figuras 24A-C muestran la eliminación por células T inducida por TCB 36F2, TCB 16D5, TCB 16D5 clásico, TCB 16D5 1+1 y TCB 16D5 HT de células tumorales humanas Hela (FolR1 elevado) (Fig. 24A), Skov-3 (FolR1 medio) (Fig. 24B) y HT-29 (FolR1 bajo) (Fig. 24C) (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras, tiempo de incubación 24 h). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión.

Las figuras 25A-C muestran la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD8+ (Fig. 25A, B) y CD4+ (Fig. 25C), después de la eliminación mediada por células T de células HeLa (FolR1 alto) (Fig. 25A), células Skov-3 (FolR1 medio) (Fig. 25 B) y células HT-29 (FolR1 bajo) (Fig. 25C) (E:T = 10:1, 48 h de incubación) inducida por TCB 36F2, TCB 16D5 y TCB DP47 (control sin unión).

Las figuras 26A-F muestran la eliminación por células T inducida por TCB 36F2, TCB 16D5 y TCB DP47 de células epiteliales corticales renales (Fig. 26A, B), células epiteliales pigmentarias retinales humanas (Fig. 26C, D) y células HT-29 (Fig. 26E, F) tras 24h (Fig. 26A, C, E) y 48 h (Fig. 26B, D, F) de incubación (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras).

La figura 27 ilustra una tabla que resume la cuantificación de los sitios de unión a FolR1 en varias líneas celulares normales y de cáncer.

Las figuras 28A-B muestran la unión de TCB 16D5 y sus correspondientes variantes de desamidación de CD3, TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA a CD3 humano expresado en células Jurkat.

Las figuras 29A-B muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas SKov-3 (FolR1 medio) inducida por TCB 16D5 y sus correspondientes variantes de desamidación de CD3, TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA (Fig. 29A) (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras, tiempo de incubación 24 h). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión.

Las figuras 30A-B muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas HT-29 (FolR1 bajo) inducida por TCB 16D5 y sus correspondientes variantes de desamidación de CD3, TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA (Fig. 30

A) (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras, tiempo de incubación 24 h). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión.

Las figuras 31A-C muestran la intensidad media de fluorescencia y la lisis de células tumorales.

Las figuras 32A-E muestran la unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HeLa.

La figura 33 muestra la unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y las dos variantes de afinidad reducida de 16D5, TCB 16D5 W96Y/D52E y TCB 16D5 G49S/S93A a FolR1 en células HeLa.

Las figuras 34A-E muestran la unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HT-29.

Las figuras 35A-D muestran la unión de moléculas de unión intermedia a FolR1 (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), TCB 16D5 y TCB 36F2 a células HEK293T que expresan FolR1 o FolR2 de ser humano o de ratón.

Las figuras 36A-F muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas HeLa (alta expresión de FolR1), SKov-3 (expresión media de FolR1) y HT-29 (baja expresión de FolR1) inducida por moléculas de unión intermedia a FolR1 (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), TCB 16D5 y TCB 36F2 tras 24 h (A-C) y 48 h (D-F) de incubación. Se usaron PBMC humanos como células efectoras (E:T = 10:1).

Las figuras 37A-F muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas HeLa (alta expresión de FolR1), SKov-3 (expresión media de FolR1) y HT-29 (baja expresión de FolR1) inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5-G49S/K53A, TCB 16D5 W96Y, TCB 16D5 W96Y/D52E), TCB 16D5 y TCB 36F2 tras 24 h (Fig 38A-C) y 48 h (Fig. 38D-F) de incubación. Se usaron PBMC humanos como células efectoras (E:T = 10:1).

Las figuras 38A-F muestran la eliminación por células T de células primarias humanas de epitelio pigmentario retinal y de epitelio cortical renal inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E), TCB 16D5, TCB 36F2 y la molécula de unión intermedia a FolR1, TCB 14B1 evaluada tras 24 h (Fig.39A-C) y 48 h (Fig.39D-F) de incubación (E:T =

10:1, PBMC humanas efectoras). Se incluyeron células HT-29 (baja expresión de FolR1) como línea celular de control y TCB DP47 sirvió como control sin unión.

Las figuras 39A muestra la FC de una sola dosis de construcciones de TCB de FOLR1 en ratones NOG hembra.

Las figuras 40A-G muestran la eficacia *in vivo* de construcciones de TCB de FOLR1 (16D5, 16D5 G49S/S93A y 16D5 W96Y/D52E) tras la transferencia de PBMC humanos en ratones NOG portadores de HeLa.

La figura 41 muestra que Farletuzumab (verde oscuro, segundo desde arriba) y Mov19 (gris, superior) son capaces de unirse a huFolR1 que se captura en 16D5, demostrando que las moléculas de unión de la serie 16D5 reconoce un epítopo distinto del reconocido por Farletuzumab o Mov19.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento tal como se usan generalmente en la técnica, a menos que se defina lo contrario a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos de los mismos.

El término "biespecífico" significa que la molécula de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende al menos dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica es capaz de unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, particularmente a dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

El término "valente" tal como se usa en el presente documento indica la presencia de un número específico de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. Como tales, la expresión "unión monovalente a un antígeno" indica la presencia de un sitio de unión a antígeno (y a no más de uno) específico para el antígeno en la molécula de unión a antígeno.

Un "sitio de unión a antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más restos de aminoácidos, de una molécula de unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende restos de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina nativa tiene típicamente dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab tiene típicamente un solo sitio de unión a antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "resto de unión a antígeno" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, un resto de unión a antígeno es capaz de dirigir a la entidad a la que se une (por ejemplo, un segundo resto de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico. En otra realización, un resto de unión a antígeno es capaz de activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno de complejo de receptor de célula T. Los restos de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos tal como se definen adicionalmente en el presente documento. Los restos de unión a antígeno particulares incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo tal como se definen adicionalmente en el presente documento y como se conocen en la técnica. Las regiones constantes de cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α, δ, ε, γ, o μ. Las regiones constantes de cadena ligera útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "determinante antigénico" es sinónima con "antígeno" y "epítopo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un conjunto de aminoácidos contiguos o una configuración conformacional compuesta de diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles pueden encontrarse, por ejemplo, sobre las superficies de células tumorales, sobre las superficies de células infectadas por virus, sobre las superficies de células enfermas, sobre las superficies de células inmunitarias, libres en el suero sanguíneo, y/o en la matriz extracelular (ME). Las proteínas citadas como antígenos en el presente documento, por ejemplo, FolR1 y CD3, pueden ser cualquier forma nativa de proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En una realización particular, el antígeno es una

proteína humana. En los casos donde se hace referencia en el presente documento a una proteína específica, el término abarca la proteína de "longitud completa" no procesada así como cualquier forma de la proteína que sea el resultado de su procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de la proteína, por ejemplo, variantes de corte y empalme alternativo o variantes alélicas. Las proteínas humanas ejemplares útiles como antígenos incluyen, pero sin limitación: FolR1 (receptor alfa de folato (FRA); proteína de unión a folato (FBP); FolR1 humana, n.º de UniProt: P15328; FolR1 murina, n.º de UniProt: P35846; FolR1 de cinomolgo, n.º de UniProt: G7PR14) y CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase en n.º de UniProt P07766 (versión 130), n.º RefSeq del NCBI NP:000724.1, SEC ID Nº: 150 para la secuencia humana; o el n.º de UniProt Q95LI5 (versión 49), n.º GenBank del NCBI BAB71849.1, para la secuencia de cinomolgo [*Macaca fascicularis*]). La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención se une a un epítopo de CD3 o a un antígeno de célula diana que está conservado entre las CD3 o antígenos diana de diferentes especies. En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención se une a CD3 y a FolR1, pero no se une a FolR2 (receptor beta de folato; FRB; FolR2 humana, n.º de UniProt: P14207) o a FolR3 (receptor gamma de folato; FolR3 humana, n.º de UniProt: P41439).

Por "unión específica" se pretende indicar que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un resto de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico puede medirse bien mediante un ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), y los ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En una realización, el alcance de la unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es menos de aproximadamente el 10 % de la unión del resto de unión a antígeno medida, por ejemplo, mediante SPR. En determinadas realizaciones, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión a antígeno que comprende ese resto de unión a antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de ≤ 1 µM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM, o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menor, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Afinidad" 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 receptor) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión

intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, un resto de unión a antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{off} y k_{on}, respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la relación de las constantes de velocidad siga siendo la misma. La afinidad puede medirse mediante métodos bien establecidos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Un método particular para medir la afinidad es resonancia de plasmón superficial (SPR).

La "unión reducida", por ejemplo, la unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, medida, por ejemplo, mediante SPR. Por claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad a cero (o por debajo del límite de detección del método analítico), es decir, la eliminación completa de la interacción. Por el contrario, la "unión aumentada" se refiere a un aumento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

La "activación de células T", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, en particular de un linfocito T citotóxico, seleccionada entre: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica, y expresión de marcadores de activación. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención son capaces de inducir la activación de células T. Los ensayos adecuados para medir la activación de células T se conocen en la técnica descrita en el presente documento.

Un "antígeno de célula diana", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico presentado sobre la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor, tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. En particular, "antígeno de célula diana" se refiere al receptor 1 de folato.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "primero" y "segundo" con respecto a restos de unión a antígeno etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir un orden u orientación específica de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a menos que esto se afirme expresamente.

Una "molécula de Fab" se refiere a una proteína que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y el dominio VL y VL de la cadena ligera (la "cadena ligera de Fab") de una inmunoglobulina.

La expresión "moléculas de Fab que tienen cadenas ligeras VLCL idénticas", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de unión que

comparten una cadena ligera pero que siguen teniendo especificidades separadas, por ejemplo, pueden unirse a CD3 o a FolR1. En algunas realizaciones, las moléculas biespecíficas activadoras de células T comprenden al menos dos moléculas de Fab que tienen cadenas ligeras VLCL idénticas. Las cadenas pesadas correspondientes se remodelan y confieren unión específica al antígeno biespecífico CD3 activador de células T y al antígeno de célula diana FolR1, respectivamente.

Por "fusionado" se entiende que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad de dominio Fc) están unidos mediante enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más enlazadores peptídicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "monocatenario" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente por enlaces peptídicos. En determinadas realizaciones, uno de los restos de unión a antígeno puede ser una molécula de Fab monocatenaria, es decir, una molécula de Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están conectadas mediante un enlazador peptídico para formar una sola cadena polipeptídica. En una realización particular similar, se conecta el extremo C-terminal de la cadena ligera de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab en la molécula de Fab monocatenaria.

Se entiende que una molécula Fab "sobrecruzada" (también denominada "Crossfab") es una molécula Fab en la que bien las regiones variables o las regiones constantes de la cadena ligera y pesada de Fab están intercambiadas, es decir, la molécula de Fab sobrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena ligera y de la región constante de cadena pesada, y una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena pesada y de la región constante de cadena ligera. Por claridad, en una molécula Fab sobrecruzada en la que las regiones variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están intercambiadas, la cadena peptídica que comprende la región constante de cadena pesada se cita en el presente documento como la "cadena pesada" de la molécula Fab sobrecruzada. Por el contrario, en una molécula Fab sobrecruzada en la que las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están intercambiadas, la cadena peptídica que comprende la región variable de cadena pesada se cita en el presente documento como la "cadena pesada" de la molécula Fab sobrecruzada. Un anticuerpo que comprende una o más CrossFab se cita en el presente documento como "CrossMab".

En contraste con esto, se entiende que una molécula Fab "convencional" es una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta de las regiones variables y constantes de cadena pesada (VH-CH1), y una cadena ligera compuesta de las regiones variables y constantes de la cadena ligera (VL-CL).

La expresión "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo de origen natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase de IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que están unidas por enlaces disulfuro. De N- a C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamado dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3), también llamado región constante de cadena pesada. De manera similar, de N- a C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominado dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio constante de cadena ligera (CL), también llamado región constante de cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), o μ (IgM), algunos de los cuales pueden dividirse adicionalmente en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG_1), γ_2 (IgG_2), γ_3 (IgG_3), γ_4 (IgG_4), α_1 (IgA_1) y α_2 (IgA_2). La cadena ligera de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, unidos a través de la región bisagra de la inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca varas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación a Fv, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv), y anticuerpos de un solo dominio. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.571.894 y 5.587.458. Para la discusión de fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden restos de epítopo de unión a receptor salvajes y que tienen semivida in vivo aumentada, véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med

9, 129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nº 6.248.516 B1). Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante varias técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), tal como se describe en el presente documento.

La expresión "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a una parte o a la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt et al., Kuby Immunology, 6ª Ed, W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o forman las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo estas últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o están implicadas en el reconocimiento de antígenos. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se citan como "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), y estos términos se usan de

manera intercambiable en el presente documento en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) y por Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende encontrarse dentro del alcance del término tal como se define y usa en el presente documento. Los restos de aminoácidos adecuados que abarcan las CDR tal como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen en la Tabla 1 a modo de comparación. El número exacto de restos que abarca una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de manera rutinaria qué restos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA A. Definiciones de CDR[1]

CDR	**Kabat**	**Chothia**	**AbM[2]**
CDR1 de V_H	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V_H	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V_H	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V_L	24-34	26-32	24-34
CDR2 de V_L	50-56	50-52	50-56
CDR3 de V_L	89-97	91-96	89-97

[1] La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla A es de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat et al. (véase más adelante).

[2] "AbM" con una “b” minúscula, tal como se usa en la Tabla A se refiere a las CDR tal como se definen por el programa de modelado de anticuerpos de Oxford Molecular's, "AbM".

Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto habitual en la materia puede asignar de manera unívoca este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de región variable, sin basarse en cualquier dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Tal como se usa en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of

Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones de restos de aminoácidos específicas en una región variable de anticuerpo son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Las secuencias polipeptídicas del ligado de secuencia no se numeran según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, se encuentra dentro de las capacidades del experto en la materia la conversión de la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

"Marco conservada" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La región FR de un dominio variable consiste de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseída por su cadena pesada. Hay cuatro clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, e IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente.

La expresión "dominio Fc" o "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar, normalmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Una "subunidad" de un dominio Fc, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el domino Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de auto asociarse establemente. Por ejemplo, una subunidad de un domino Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG y un dominio constante CH3 de IgG.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación de la estructura peptídica o las modificaciones

postraduccionales de una subunidad de dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad de dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación que promueve la asociación, tal como se usa en el presente documento, incluye particularmente modificaciones separadas efectuadas a cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desea que se asocien (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), siendo las modificaciones complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades de dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas de las subunidades de dominio Fc para hacer que su asociación se estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por lo tanto, la (hetero)dimerización sucede entre un polipéptido que comprende la primera subunidad de dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad de dominio Fc, que pueden no ser idénticas en el sentido que los componentes fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son iguales. En algunas realizaciones, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácidos en el dominio Fc, específicamente una sustitución de aminoácidos. En una realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácidos separada, específicamente una sustitución de aminoácidos, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión a receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos, regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B), y activación de células B.

Tal como se usa en el presente documento, se considera que los términos "diseñar, diseñado, diseño", incluyen cualquier manipulación de la estructura peptídica o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido de origen natural o recombinante o un fragmento del mismo. El diseño incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación, o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estas estrategias.

La expresión "mutación de aminoácido", tal como se usa en el presente documento pretende abarcar sustituciones, eliminaciones, inserciones, y modificaciones de aminoácidos. Cualquier combinación de sustitución, eliminación inserción, y modificación se efectúa para llegar a la construcción final, siempre que la

construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc, o una asociación aumentada con otro péptido. Las eliminaciones e inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen eliminaciones e inserciones en amino y/o carboxilo terminal de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos son mutaciones particulares de aminoácidos. Con el fin de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, se prefieren particularmente las sustituciones de aminoácidos no conservativas, es decir, reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones de aminoácidos incluyen el reemplazo con aminoácidos de origen no natural o con derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Las mutaciones de aminoácidos pueden generarse usando métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis de sitio dirigido, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que los métodos para alterar el grupo de cadena lateral de un aminoácido mediante métodos distintos a ingeniería genética, tales como modificación química, también puedan ser útiles. Pueden usarse varias designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación de aminoácidos. Por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina puede indicarse como 329G, G329, G_{329}, P329G, o Pro329Gly.

Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) enlazados linealmente mediante enlaces de amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido" y el término "polipéptido puede usarse en lugar de, o de manera intercambiable con cualquiera de estos términos. También se entiende que el término "polipéptido" se refiere a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, o modificación mediante aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido puede proceder de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier modo, incluyendo mediante síntesis química. Un polipéptido de la invención puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más

aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se citan como plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se citan como no plegados.

Por un polipéptido "aislado" o una variante o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se necesita un nivel particular de purificación. Por ejemplo, puede retirarse un polipéptido aislado de su ambiente nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células hospedadoras se consideran aislados para los fines de la invención, como lo son polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada.

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" respecto de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir los espacios en blanco, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc., y el código fuente, junto con las instrucciones para su uso, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el Nº de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V 4.0 D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan por el programa ALIGN-2 y no

varían. En las situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de restos de aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que en los casos donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A para B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B para A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN de procedencia viral, o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN). La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su ambiente natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante contenido en un vector que codifica un polipéptido se considera aislado para los fines de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que normalmente contienen a la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente extracromosomalmente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas de hebra positiva y negativa, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos

nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención comprenden además dichas moléculas producidas de manera sintética. Además, un polinucleótido o ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión a ribosomas, o un terminador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, "idéntica" en un 95 % a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia del nucleótido de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse por otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden suceder en las posiciones terminales 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como asunto práctico, si una secuencia de polinucleótidos particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica con una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede determinarse de manera convencional usando programas informáticos conocidos, tales como los discutidos anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

La expresión "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácidos nucleicos especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinadas realizaciones, el casete de expresión de la invención comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

El término "vector" o la expresión "vector de expresión" son sinónimos de la expresión "construcción de expresión" y se refieren a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de manera operativa en una célula diana. El término incluye el vector como una

estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. El vector de expresión permite la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por la maquinaria de transcripción y/o traducción celular. En una realización, el vector de la expresión comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora" y "cultivo de células hospedadoras" se usan de manera intercambiable y se refiere a células en las cuales se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la progenie derivada de esta independientemente del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. Se incluye en el presente documento la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o seleccionada en la célula transformada originalmente. Una célula hospedadora es cualquier tipo de sistema celular que pueda usarse para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto, y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal.

Un "receptor Fc activador" es un receptor Fc que después de la ocupación por un dominio Fc de un anticuerpo provoca eventos de señalización que estimulan a células portadoras de receptores para llevar a cabo las funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis por células efectoras inmunitarias de las células diana recubiertas de anticuerpo. Las células diana son células a las que los anticuerpos o los derivados de las mismas que comprenden una región Fc se unen específicamente, generalmente a través de la parte de la proteína que está en N-terminal con la región Fc. Tal como se usa en el presente documento, la expresión

"ADCC reducida" se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo en el medio que rodea a las células diana, mediante el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea a las células diana, necesaria para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, mediante el mecanismo de ADCC. La reducción en la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células hospedadoras, usando los mismos métodos convencionales de producción, purificación, formulación y almacenamiento (que son conocidos para los expertos en la materia), pero que no se ha modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, la reducción en la ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácidos que reduce la ADCC, es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución de aminoácido en el dominio Fc. Se conocen bien en la materia ensayos para medir la ADCC (véase, por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO 2006/082515 o la Publicación PCT n.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al cual se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene los efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros, y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos como monos), conejos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en esta sea efectivo, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural una enfermedad en el individuo que se esté tratando, y se puede realizar tanto como profilaxis o durante la evolución de

una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de síntomas, la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de evolución de la enfermedad, la mejora o alivio de la patología, y la remisión o un pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "antagonista" se usa en su sentido más amplio, e incluye a cualquier molécula que bloquee, inhiba, o neutralice parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgada en el presente documento. De manera similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que induzca una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en el presente documento. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpo, incluyendo fragmentos de anticuerpo modificados por ingeniería genética, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto el polipéptido con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido.

El término “prospecto” se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

Todas las referencias, publicaciones, patentes y solicitudes de patente divulgadas en el presente documento se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Descripción detallada de las realizaciones

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención es biespecífica, es decir, comprende al menos dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos, es decir, a CD3 y a FolR1. De acuerdo con la invención, los restos de unión a antígeno son moléculas Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos de una

cadena pesada y una ligera, cada una comprendiendo una región variable y una constante). En una realización, dichas moléculas Fab son humanas. En otra realización, dichas moléculas Fab están humanizadas. En otra realización más, dichas moléculas Fab comprenden regiones constantes de cadena pesada y ligera humana.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención es capaz de unirse simultáneamente al antígeno de FolR1 y a CD3 de la célula diana. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es capaz de reticular a una célula T y a una célula diana que expresa FolR1 mediante la unión simultánea al antígeno de FolR1 y a CD3 de la célula diana. En una realización aún más particular, dicha unión simultánea da como resultado la lisis de la célula diana que expresa FolR1, en particular, una célula tumoral que expresa FolR1. En una realización, dicha unión simultánea da como resultado la activación de las células T. En otras realizaciones, dicha unión simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, en particular de un linfocito T citotóxico, seleccionada entre el grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica, y expresión de marcadores de activación. En una realización, la unión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a CD3 sin unión simultánea al antígeno de FolR1 de la célula diana no da como resultado la activación de las células T.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es capaz de redirigir la actividad citotóxica de una célula T a una célula diana que expresa FolR1. En una realización particular, dicha redirección es independiente de la presentación de péptidos antigénicos mediada por el CMH por la célula diana y/o de la especificidad de la célula T.

En particular, una célula T de acuerdo con algunas de las realizaciones de la invención es una célula T citotóxica. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T $CD4^+$ o $CD8^+$, en particular una célula T $CD8^+$.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3 (también citado en el presente documento como un "resto de unión a antígeno de CD3" o "primer resto de unión a antígeno"). En una realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T proporciona unión monovalente a CD3. En una realización particular, CD3 es CD3 humano o CD3 de cinomolgo, más particularmente CD3 humano. En una realización particular, el resto de unión a antígeno de CD3 tiene reactividad cruzada (es decir, se une

específicamente a) para CD3 humano y de cinomolgo. En algunas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a la subunidad épsilon de CD3 (véase en n.º de UniProt P07766 (versión 130), n.º RefSeq del NCBI NP:000724.1, SEC ID Nº: 150 para la secuencia humana; n.º de UniProt Q95LI5 (versión 49), n.º GenBank del NCBI BAB71849.1, para la secuencia de cinomolgo [*Macaca fascicularis*]).

En algunas realizaciones, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

En una realización, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

En una realización, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEC ID Nº: 31.

EN una realización, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno capaz de unirse al antígeno de FolR1 de la célula diana (también citado en el presente documento como "resto de unión a FolR1" o "segundo" o "tercer" resto de unión a antígeno). En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse al antígeno de FolR1 de la célula diana no se une a FolR2 o FolR3. En una realización particular, el resto de unión a antígeno de FolR1 tiene reactividad cruzada (es decir, se une específicamente a) para FolR1 humano y de cinomolgo. En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende dos restos de unión a antígeno capaces de unirse al antígeno de FolR1 de la célula diana. En una realización particular similar, cada uno de estos restos de unión a antígeno se une específicamente al mismo determinante antigénico. En una realización aún más particular, todos estos restos de unión a antígeno son idénticos. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende no

más de dos restos de unión a antígeno capaces de unirse a FolR1.

El resto de unión a FolR1 es generalmente una molécula Fab que se une específicamente a FolR1 y es capaz de dirigir a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a la que se conecta a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo de célula tumoral específico que expresa FolR1.

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34; y

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1).

En una realización, el primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores comprende además un dominio Fc compuesto de al menos una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable.

En una realización, el primer resto de unión a antígeno y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-

terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, opcionalmente a través de un enlazador peptídico.

En una realización particular adicional, hay presente no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (es decir, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T proporciona unión monovalente a CD3).

Molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T con una cadena ligera común

Los inventores de la presente invención generaron un anticuerpo biespecífico en el que los restos de unión comparten una cadena ligera común que mantiene la especificidad y eficacia del anticuerpo monoespecífico progenitor para CD3 y que puede unirse a un segundo antígeno (por ejemplo, FolR1) usando la misma cadena ligera. La generación de una molécula biespecífica con una cadena ligera común que retiene las propiedades de unión del anticuerpo progenitor no es directa ya que las CDR comunes de la cadena ligera híbrida tienen que efectuar la especificidad de unión para ambas dianas. En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, uno de los cuales es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 y el otro es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a FolR1, en la que la primera y la segunda molécula Fab tienen cadenas ligeras VLCL idénticas. En una realización, dicha cadena ligera idéntica (VLCL) comprende las CDR de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34. En una realización, dicha cadena ligera idéntica (VLCL) comprende a la SEC ID Nº: 35.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR

de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 16, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 17, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 18, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 275 y SEC ID Nº: 315 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39, y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 275 y SEC ID Nº: 315, y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, y SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 274 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 15 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31 o variantes de las mismas que mantengan funcionalidad.
En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 15, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno (que es una molécula Fab) capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 16, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 17, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 18, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a moléculas biespecíficas en las que la menos dos restos de unión a antígeno tienen cadenas ligeras idénticas y cadenas pesadas remodeladas correspondientes que confieren la unión específica al antígeno CD3 activador de células T y al antígeno FolR1 de la célula diana, respectivamente. El uso de este principio denominado "cadena ligera común", es decir, combinar dos restos de unión que comparten una cadena ligera pero que aún

tienen especificidades separadas, previene el mal emparejamiento de la cadena ligera. Por lo tanto, hay menos productos secundarios durante la producción, lo que facilita la preparación homogénea de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T.

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se ilustran en las figuras 1A-I y se describen adicionalmente a continuación.

En algunas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociación estable. Más adelante se describen realizaciones ejemplares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc.

Molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T con con un fragmento Fab sobrecruzado

Los inventores de la presente invención generaron un segundo formato de anticuerpo biespecífico en el que uno de los restos de unión a antígeno es un fragmento Fab sobrecruzado. En un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo biespecífico monovalente, en el que uno de los fragmentos Fab de una molécula de IgG se reemplaza por un fragmento Fab sobrecruzado. Los fragmentos Fab sobrecruzados son fragmentos Fab en los que bien las regiones variables o las regiones constantes de la cadena ligera y pesada están intercambiadas. Los formatos de anticuerpo biespecífico que comprenden fragmentos Fab sobrecruzados se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO2009080252, WO2009080253, WO2009080251, WO2009080254, WO2010/136172, WO2010/145792 y WO2013/026831. En una realización particular, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada en la que bien las regiones variables o las constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas. Dicha modificación previene el mal emparejamiento de las cadenas pesadas y ligeras de diferentes moléculas Fab, mejorando de este modo el rendimiento y pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en producción recombinante. En una molécula Fab sobrecruzada particular útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención, las regiones variables de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas. En otra molécula Fab sobrecruzada útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de

células T de la invención, las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas

En una realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 55 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 64 o variantes de las mismas que mantengan funcionalidad.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 55, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 64.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos

una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 50 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.
En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 51.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.

En una realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para

FolR1 comprende una región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEC ID Nº: 49 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 51 o variantes de las mismas que mantengan funcionalidad.
En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 49, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 51.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 49 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54.

(iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 50 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno y el tercer resto de unión a antígeno son ambos una molécula Fab convencional.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 51.

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada

variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 51.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno y el tercer resto de unión a antígeno son ambos una molécula Fab convencional.

Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a moléculas biespecíficas en las que dos restos de unión a antígeno confieren unión específica a FolR1 y un resto de unión a antígeno confiere especificidad para el antígeno CD3 activador de células T. Una de las cadenas pesadas se modifica para asegurar un emparejamiento adecuado de las cadenas ligera y pesada, eliminando de este modo la necesidad de una estrategia de cadena ligera común. La presencia de dos sitios de unión a FolR1 permite un acoplamiento adecuado con el antígeno de FolR1 diana y la activación de células T.

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se ilustran en las figuras 1A-I y se describen adicionalmente a continuación.

En algunas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociación estable. Más adelante se describen realizaciones ejemplares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc.

Formatos de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T

Tal como se ilustra anteriormente en las figuras 1A-I, en una realización, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T comprenden al menos dos fragmentos Fab que tienen cadenas ligeras idénticas (VLCL) y que tienen cadenas pesadas diferentes (VHCL) que confieren las especificidades para dos antígenos diferentes, es decir, un fragmento Fab es capaz de unirse específicamente a un antígeno de CD3 activador de células T y el otro fragmento Fab es capaz de unirse específicamente al antígeno de FolR1 de la célula diana.

En otra realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende al menos dos restos de unión a antígeno (moléculas Fab), uno de los cuales es una molécula Fab sobrecruzada y uno de los cuales es una molécula Fab convencional. En una realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab

sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional.

Estos componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se ilustran en las figuras 1A-I.

En algunas realizaciones, el primero y segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el primero y segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización similar, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno, y el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización similar, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse

específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

En otras realizaciones, el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización particular similar, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización similar, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

Los restos de unión a antígeno pueden estar fusionados al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un enlazador peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los enlazadores peptídicos se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Los enlazadores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los enlazadores peptídicos $(G_4S)_n$ (SEC ID Nº: 300), $(SG_4)_n$ (SEC ID Nº: 301), $(G_4S)_n$ (SEC ID Nº: 300) o $G_4(SG_4)_n$ (SEC ID Nº: 302). “n” es generalmente un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4. Un enlazador peptídico particularmente adecuado para fusionar las cadenas ligeras de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno entre sí es $(G_4S)_2$ (SEC ID Nº: 303). Un enlazador peptídico adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo resto de unión a

antígeno es EPKSC(D)-$(G_4S)_2$.(SEC ID Nº: 304 y 305). Adicionalmente, los enlazantes pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. Particularmente en los casos donde un resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo N-terminal de una subunidad de dominio Fc, puede fusionarse a través de una región bisagra de inmunoglobulina o una porción del mismo, con o sin un enlazador peptídico adicional.

Los inventores de la presente invención han descubierto que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dos restos de unión a antígeno específicos para el antígeno de FolR1 de la célula diana tiene características superiores en comparación con la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende solo el resto de unión para el antígeno de FolR1 de la célula diana.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífico activadora de células T de la invención comprende además un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a FolR1. En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno (es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos).

En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización similar, el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son

fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo y tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del tercer resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de célula T de la invención comprende cinco cadenas polipeptídicas que forman un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno en el que el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse a CD3 y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son cada uno capaces de unirse al receptor 1 de folato (FolR1). La primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden, en dirección de amino (N)-terminal a carboxilo (C)-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (VLD1) y un primer dominio constante de cadena ligera (CLD1). La tercera cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, un segundo dominio variable de cadena ligera (VLD2) y un segundo dominio constante 1 de cadena pesada (CH1D2). La cuarta cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (VHD1), un primer dominio constante 1 de cadena pesada (CH1D1), un primer dominio constante 2 de cadena pesada (CH2D1) y un primer dominio constante 3 de cadena pesada (CH3D1). La quinta cadena polipeptídica comprende VHD1, CH1D1, un segundo dominio variable de cadena pesada (VHD2), un segundo dominio constante de cadena ligera (CLD2), un segundo dominio constante 2 de cadena pesada (CH2D2) y un segundo dominio constante 3 de cadena pesada (CH3D2). La tercera cadena polipeptídica y VHD2 y CLD2 de la quinta cadena polipeptídica forman el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3. La segunda cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la quinta cadena polipeptídica forman el tercer resto de unión capaz de unirse a FolR1. La primera cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la cuarta cadena polipeptídica forman el segundo resto de unión capaz de unirse a FolR1.

En otra realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o segunda subunidad del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una

primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del tercer resto de unión a antígeno. En una realización similar, el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo y tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

Los restos de unión a antígeno pueden estar fusionados al dominio Fc a través de un enlazador peptídico. En una realización particular, los restos de unión a antígeno se fusionan cada uno al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG_1 humana.

En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina. En una realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase IgG. En una realización aún más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG_1. En otra realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG_4. En una realización particular adicional, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otras realizaciones, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada.

En una realización particular, en dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas, en la que el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de

cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34.

En una realización particular, en dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas, en la que el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 36, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 31; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 15, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 31.

En una realización particular, en dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno y el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada en la que las regiones variables o constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están intercambiadas, en la que el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 36, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 31; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 55, una cadena ligera variable que

comprende una secuencia de SEC ID Nº: 65.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es monovalente para cada antígeno. En una realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede unirse a CD3 humana y al receptor alfa de folato (FolR1) humano y se elaboró sin emplear una estrategia de heterodimerización, tal como, por ejemplo, la tecnología de pomos en agujeros. Por ejemplo, la molécula puede producirse empleando una biblioteca de cadena ligera común y tecnología CrossMab. En una realización particular, la región variable de las moléculas de unión a CD3 se fusiona al dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano convencional para formar la molécula cruzada VLVH (fusionada a Fc) que es común para ambas especificidades. Para generar los homólogos cruzados (VHCL), se fusiona un dominio variable de cadena pesada específico de CD3 a una cadena ligera □ humana constante mientras que un dominio variable de cadena pesada específico para FolR1 (por ejemplo, aislado de una biblioteca de cadena ligera común) se fusiona a una cadena ligera □ humana constante. La molécula resultante deseada con cadenas correctamente emparejadas comprende cadenas ligeras tanto kappa como lambda o fragmentos de las mismas. En consecuencia, esta especie de moléculas biespecíficas puede purificarse a partir de especies mal emparejadas u homodiméricas con etapas de purificación secuencial que seleccionan respecto de cadena ligera kappa y lambda, en ambas secuencias. En una realización particular, la purificación del anticuerpo biespecífico deseado emplea etapas posteriores de purificación con columnas KappaSelect y LambdaFabSelect (GE Healthcare) para eliminar los anticuerpos homodiméricos no deseados.

Dominio Fc

El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, comprendiendo cada subunidad de este los dominios constantes CH2 y CH3 de la cadena pesada de la IgG. Las dos subunidades del dominio Fc son capaces de asociarse de manera estable entre sí. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención comprende no más de un dominio Fc.

En una realización de acuerdo con la invención, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es un dominio Fc de IgG. En una realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1. En otra realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_4. En una realización más

específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_4 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular, la sustitución de aminoácidos S228P. Esta sustitución de aminoácidos reduce el intercambio de brazo de Fab *in vivo* de los anticuerpos de IgG_4 (véase Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En una realización particular adicional el dominio Fc es humano. Una secuencia ejemplar de una región Fc de IgG_1 humana se proporciona en la SEC ID Nº: 245.

Modificaciones de dominio Fc que promueven la heterodimerización

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de acuerdo con la invención comprenden diferentes restos de unión a antígeno, fusionados a una o a la otra de las dos subunidades del dominio Fc, por lo tanto, las dos subunidades del dominio Fc comprenden típicamente dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización da lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T en producción recombinante, será por lo tanto ventajoso introducir en el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

Por consiguiente, en realizaciones particulares del dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífico activadora de células T de acuerdo con la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensiva entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana se encuentra en el dominio CH3 del dominio Fc. Por lo tanto, en una realización, dicha modificación es en el dominio CH3 del dominio Fc.

En una realización específica, dicha modificación es una modificación denominada de "pomo en agujero", que comprende una modificación de "pomo" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "agujero" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de pomo en agujero se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) y en Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el método implica introducir una protuberancia ("pomo") en la interfaz de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("agujero") en la interfaz de un segundo polipéptido, de tal forma que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímero e impedir la formación de homodímero. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz

del primer polipéptido con cadenas más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido sustituyendo cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

Por consiguiente, en una realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de los la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención se reemplaza un resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga un volumen de cadena lateral mayor, generando de este modo una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que puede posicionarse en una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que puede posicionarse la protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad.

La protuberancia y la cavidad pueden efectuarse alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis de sitio dirigido, o mediante síntesis peptídica.

En una realización específica, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza por un resto de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc el resto de tirosina en la posición 407 se reemplaza por un resto de valina (Y407V). En una realización, en la segunda subunidad del dominio Fc el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza adicionalmente con un resto de serina (T366S) y el resto de leucina en la posición 368 se reemplaza con un resto de alanina (L368A).

En una realización adicional más, en la primera subunidad del dominio Fc el resto de serina en la posición 354 se reemplaza adicionalmente por un resto de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc el resto de tirosina en la posición 349 se reemplaza adicionalmente por un resto de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos restos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, de este modo estabilizando adicionalmente al dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En una realización particular, el resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3 se fusiona (opcionalmente a través del resto de unión a antígeno capaz de unirse a FolR1 en un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación de "pomo"). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la fusión del resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3 a la subunidad que contiene el pomo del dominio Fc minimizará (adicionalmente) la generación de

moléculas de unión a antígeno que comprenden dos restos de unión a antígeno capaces de unirse a CD3 (choque estérico de dos polipéptidos que contienen pomos).

En una realización alternativa, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media efectos de direccionamiento electrostático, por ejemplo, tal como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este método implica el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc por medio de restos de aminoácidos cargados de tal forma que la formación de homodímeros es electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

Modificaciones de dominio Fc que suprimen la unión a receptor Fc y/o la función efectora

El dominio Fc confiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una relación de distribución tejido-sangre favorable. A la vez puede, sin embargo, dan lugar a un direccionamiento no deseado de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a células que expresan receptores Fc en vez de a las células portadoras de antígeno preferidas. Además, la activación conjunta de las rutas de señalización de receptor Fc pueden dar lugar a liberación de citocinas que, en combinación con las propiedades de activación de células T y la larga semivida de la molécula de unión a antígeno, da como resultado la activación excesiva de los receptores de citocinas y graves efectos secundarios tras su administración sistémica. La activación de células inmunes (portadoras de receptor Fc) distintas de células T puede incluso reducir la eficacia de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T debido a la destrucción potencial de células T, por ejemplo, por células NK.

Por consiguiente, en realizaciones particulares, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de acuerdo con la invención muestra afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo. En una realización similar, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestra menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20%, más preferentemente menos de un 10% y lo más preferentemente menos de un 5% de la afinidad de unión a un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG_1

nativo), y/o menos de un 50%, preferentemente menos de un 20%, más preferentemente menos de un 10% y lo más preferentemente menos de un 5% de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG_1 nativo). En una realización, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce función efectora. En una realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En una realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En una realización, el receptor Fc es un receptor Fc activante. En una realización específica, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano activante, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. En una realización, la función efectora es una o más seleccionada entre el grupo de CDC, ADCC, ADCP, y secreción de citocinas. En una realización particular, la función efectora es ADCC. En una realización, el dominio Fc muestra una afinidad de unión sustancialmente similar al receptor de Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio de Fc de IgG_1 nativo. La unión sustancialmente similar a FcRn se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestra más de aproximadamente un 70%, particularmente más de aproximadamente un 80%, más particularmente más de aproximadamente un 90% de la afinidad de unión de un dominio Fc de una IgG_1 nativa (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG_1 nativo) a FcRn.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc está diseñado para tener afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. En realizaciones particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc y/o la función efectora. Típicamente, están presentes las mismas una o más mutaciones de aminoácidos en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En una realización, la mutación de aminoácidos reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc. En una realización, la mutación de aminoácidos reduce la afinidad del dominio Fc para un receptor Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces. En realizaciones en las que hay más de una mutación de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor Fc, la combinación de estas mutaciones de aminoácidos puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces, o al menos 50 veces. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica

activadora de células T que comprende un dominio Fc diseñado muestra menos de un 20 %, particularmente menos de un 10 %, más particularmente menos de un 5 % de la afinidad de unión a un receptor de Fc en comparación con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc no diseñado. En una realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En algunas realizaciones, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En algunas realizaciones, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En una realización específica, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano activante, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunas realizaciones, la afinidad de unión a un componente de complemento, específicamente, la afinidad de unión a C1q, también se reduce. En una realización, la afinidad de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) no se reduce. La unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del dominio Fc a dicho receptor, se consigue cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestra más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma no diseñada del dominio Fc (o de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicha forma no diseñada del dominio Fc) a FcRn. El dominio Fc, o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que comprenden dicho dominio Fc, pueden mostrar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. En determinadas realizaciones, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T está diseñada para que tenga función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. La función efectora reducida puede incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos reducida, unión a células NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce apoptosis reducida, reticulación reducida de anticuerpos unidos a diana, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos T reducido. En una realización, la función efectora reducida es una o más seleccionada entre el grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida, y secreción de citocinas reducida. En una realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En una realización, la ADCC reducida es menor del 20 % de la ADCC inducida por un

dominio Fc no diseñado (o por una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc no diseñado).

En una realización, la mutación de aminoácidos que reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc y/o la función efectora es una sustitución de aminoácidos. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329. En una realización más específica, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupo de L234, L235 y P329. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A. En una realización similar, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1, particularmente, un dominio Fc de IgG_1 humana. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329. En una realización más específica, la sustitución de aminoácidos es P329A o P329G, particularmente P329G. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329 y una sustitución adicional de aminoácidos en una posición seleccionada entre E233, L234, L235, N297 y P331. En una realización más específica, la sustitución adicional de aminoácidos es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En realizaciones particulares, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones P329, L234 y L235. En realizaciones más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (“P329G LALA”). En una realización similar, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1, particularmente, un dominio Fc de IgG_1 humana. La combinación de sustituciones de aminoácidos "P329G LALA" suprime prácticamente por completo la unión a receptor de Fcγ de un dominio Fc de IgG humana, tal como se describe en la publicación PCT n.º W0 2012/130831, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad. El documento WO 2012/130831 también describe métodos para preparar dichos dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como unión a receptor Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos de IgG_4 muestran afinidad de unión reducida a receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos de IgG_1. De este modo, en algunas realizaciones, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención es un dominio Fc de IgG_4, particularmente, un dominio Fc de IgG_4 humana. En algunas realizaciones, el dominio Fc de IgG_4 comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, específicamente, la sustitución de aminoácidos S228P. Para reducir adicionalmente su afinidad de unión a un receptor Fc y/o su función efectora, en una realización, el dominio Fc de IgG_4 comprende una sustitución de aminoácidos en la posición L235, específicamente, la sustitución de aminoácidos L235E. En otra

realización, el dominio Fc de IgG_4 comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329, específicamente, la sustitución de aminoácidos P329G. En una realización particular, el dominio Fc de IgG_4 comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente, las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y P329G. Dichos mutantes de dominio Fc de IgG_4 y sus propiedades de unión a receptor de Fcγ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad.

En una realización particular, el dominio Fc que muestra afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo, es un dominio Fc de IgG_1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG_4 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y opcionalmente P329G.

En determinadas realizaciones, se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En una realización similar, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácidos en la posición N297, particularmente una sustitución de aminoácidos que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT WO 2012/130831, Los dominios Fc con unión a receptor Fc reducida y/o funciones efectoras también incluyen aquellos con sustituciones de uno o más de los restos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de restos 265 y 297 a alanina (Patente de los Estados Unidos 7.332.581).

Los dominios Fc mutantes pueden prepararse mediante eliminación de aminoácidos, sustitución, inserción o modificación usando métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis de sitio específico de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica, y similares. Los cambios de nucleótidos correctos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación.

La unión a receptores Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA, o mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando instrumentación convencional, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc, tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Un ensayo de unión similar adecuado se describe en el presente documento. Como alternativa, la afinidad de dominios Fc o de moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un dominio Fc para receptores de Fc puede evaluarse usando líneas

celulares que se sabe que expresan receptores de Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan receptor FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc, puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. En el presente documento se describe un ensayo adecuado para medir la ADCC. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.500.362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente de Estados Unidos Nº 5.821.337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, La actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunas realizaciones, la unión del dominio Fc a un componente de complemento, específicamente a C1q, se reduce. Por consiguiente, en algunas realizaciones en las que el dominio Fc está diseñado para tener función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es capaz de unirse a C1q y por lo tanto tener actividad de CDC. Véase, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Propiedades biológicas y características funcionales de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T

Un experto en la materia puede apreciar la eficacia ventajosa de una molécula que distingue de manera selectiva entre células cancerosas y no cancerosas sanas. Una forma de lograr este objetivo es mediante la selección de la diana adecuada. Los marcadores expresados exclusivamente en células tumorales pueden emplearse para dirigir de manera selectiva a moléculas o células efectoras a células tumorales

a la vez que se evitan las células normales que no expresan dicho marcador. Sin embargo, en algunos casos, los marcadores celulares denominados tumorales también se expresan en tejido normal, aunque a niveles menores. Esta expresión en tejidos normales da lugar a la posibilidad de toxicidad. Por lo tanto, había una necesidad en la técnica de moléculas que puedan dirigirse de manera más selectiva a células tumorales. La invención descrita en el presente documento proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que se dirigen de manera selectiva a células tumorales positivas a FolR1 y no a células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende al menos dos, preferentemente dos, restos de unión a FolR1 de relativamente baja afinidad que confieren un efecto de avidez que permite la diferenciación entre células con alta y baja expresión de FolR1. Debido a que las células tumorales expresan FolR1 a niveles elevados o intermedios, esta realización de la invención se une de manera selectiva a, y/o induce la eliminación de células tumorales y no células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T está en el formato invertido 2+1. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales y no tumorales positivas a FolR1 mediada por células T y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T no induce la eliminación de células normales que tienen menos de 1000 copias de FolR1 en su superficie.

Además de las características ventajosas anteriores, una realización de la invención no necesita reticulación química o una estrategia híbrida para su producción. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T capaz de producirse en células CHO. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende polipéptidos humanizados y humanos. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T no causa reticulación de FcgR. En una realización similar, la molécula de unión a antígeno

biespecífica activadora de células T es capaz de producción en células CHO y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

Como se ha indicado anteriormente, algunas realizaciones contempladas en el presente documento incluyen moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que tienen dos restos de unión que confieren unión específica a FolR1 y un resto de unión que confiere especificidad para el antígeno CD3 activador de células T, en el que cada resto de unión a FolR1 individual se acopla al antígeno con baja afinidad. Debido a que la molécula comprende dos restos de unión a antígeno que confieren unión a FolR1, la avidez general de la molécula, sin embargo, proporciona unión eficaz a células diana que expresan FolR1 y activación de células T para inducir función efectora de células T. Teniendo en consideración que mientras que FolR1 se expresa a diversos niveles en células tumorales, también se expresa a niveles muy bajos (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 copias sobre la superficie celular) en determinadas células normales, un experto en la materia puede reconocer fácilmente la eficacia ventajosa de dicha molécula para su uso como agente terapéutico. Dicha molécula se dirige de manera selectiva a células tumorales frente a células normales. Dicha molécula, por lo tanto, puede administrarse a un individuo que la necesite con una preocupación significativamente menor acerca de la toxicidad resultante de las células normales positivas a FolR1 en comparación con moléculas que se unen a FolR1 con alta afinidad para inducir función efectora. En una realización preferida, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T tienen una afinidad de unión monovalente a huFolR1 en el intervalo micromolar y una avidez por huFolR1 en el intervalo nanomolar.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 40 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 10 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una

K_D aparente de aproximadamente 10 nM y aproximadamente 30 nM, respectivamente. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 1400 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 1400 nM y a FolR1 de cinomolgo con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 5600 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 10 nM y con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 1400 nM.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 5,36 pM a aproximadamente 4 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 murino con una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM, se une a FolR1 murino con una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM, y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que

comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

Tal como se ha descrito anteriormente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T contempladas en el presente documento pueden inducir función efectora de células T, por ejemplo, expresión de marcadores de la superficie celular, producción de citocinas, eliminación mediada por células T. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación mediada por células T de la célula diana que expresa FolR1, tal como una célula tumoral humana, *in vitro*. En una realización, la célula T es una célula T CD8 positiva. Los ejemplos de células tumorales que expresan FolR1 incluyen, pero sin limitación, células HeLa, Skov-3, HT-29, y HRCEpiC. Otras células cancerosas humanas positivas a FolR1 que pueden usarse para ensayos *in vitro* están fácilmente disponibles para el experto en la materia. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. Se contemplan específicamente moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que inducen la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 36 pM después de 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 178,4 pM tras 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 134,5 pM o mayor tras 48 horas. La CE50 puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante métodos divulgados en el presente documento en los ejemplos.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores induce la regulación positiva de la expresión de la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 sobre la célula T según se mide mediante citometría de flujo. En una realización, la célula T es una célula T CD4 positiva o una célula T CD8 positiva.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a FolR1 expresado en una célula tumoral humana. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se

une a un epítopo conformacional en FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células de cualquiera de las realizaciones anteriores T no se une al receptor de folato 2 humano (FolR2) o al receptor de folato 3 humano (FolR3). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEC ID Nº: 227). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 227, a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230 y a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 o 229. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende un resto de unión a antígeno de FolR1 que se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 227, 230 y 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 o 229, y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 227 a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228, 229 o 230. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende un resto de unión a antígeno de FolR1 que se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 227 y a un

polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228, 229 o 230, y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 16, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 275, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 315, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

Con respecto a FolR1, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T contempladas en el presente documento pueden tener un efecto agonista, antagonista o neutro. Los ejemplos de efecto agonista incluyen la inducción o potenciación de la señalización a través de FolR1 tras la unión del resto de unión a FolR1 al receptor de FolR1 en la célula diana. Los ejemplos de actividad antagonista incluyen la abrogación o reducción de la señalización a través de FolR1 tras la unión del resto de unión a FolR1 al receptor de FolR1 en la célula diana. Esto puede, por ejemplo, suceder bloqueando o reduciendo la interacción entre folato con FolR1. Se contemplan específicamente variantes de secuencia de las realizaciones divulgadas en el presente documento que tienen menos afinidad a la vez que retienen las propiedades biológicas descritas anteriormente.

Inmunoconjugados

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T conjugada a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T tal como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma.

Los polinucleótidos de la invención incluyen a aquellos que son al menos

aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idénticos a las secuencias expuestas en las SEC ID Nº: 151-226, incluyendo fragmentos funcionales o variantes de los mismos.

Los polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden expresarse como un solo polinucleótido que codifica a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T o en forma de múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se expresan de manera conjunta. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se expresan de manera conjunta pueden asociarse a través, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T funcional. Por ejemplo, la parte de cadena ligera de un resto de unión a antígeno puede estar codificada por un polinucleótido separado de la parte de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la parte de cadena pesada del resto de unión a antígeno, una subunidad de dominio Fc y opcionalmente (parte de) otro resto de unión a antígeno. Cuando se expresan de manera conjunta, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar el resto de unión a antígeno. En otro ejemplo, la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende una de las dos subunidades de dominio Fc y opcionalmente (parte de) uno o más restos de unión a antígeno podría estar codificado por un polinucleótido separado de la parte de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende a la otra de las dos subunidades de dominio Fc y opcionalmente (parte de) un resto de unión a antígeno. Cuando se expresan de manera conjunta, las subunidades de dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunas realizaciones, el polinucleótido aislado codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en el presente documento. En otras realizaciones, el polinucleótido aislado codifica polipéptidos comprendidos en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en el presente documento.

En otra realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de región variable tal como se muestra en las SEC ID Nº: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 y 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219,

220, 221, 222, 223. En otra realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T o un fragmento de la misma, en la que el polipéptido comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica tal como se muestra en las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, , 58, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 1, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111.112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244. En otra realización, la invención se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una secuencia nucleotídica mostrada en las SEC ID Nº: 97, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 12, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 246, 247. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos mostrada en las SEC ID Nº: 97, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 12, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 246, 247. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de región variable que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos en las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11,13, 15, 19, 21, 12, 25, 27, 29, 31, 36, 41, 45, 49, 51, 55, 58, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 82, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 12, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica

activadora de células T o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende una o más secuencias que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a una secuencia de aminoácidos en las SEC ID Nº: 8, 9, 50, 37, 38, y 39. La invención abarca un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia de la región variable de las SEC ID Nº: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 y 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223 con sustituciones conservativas de aminoácidos. La invención también abarca un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia polipeptídica de las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 1, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111.112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 con sustituciones conservativas de aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Métodos recombinantes

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, mediante síntesis peptídica en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento), por ejemplo, tal como se han descrito anteriormente, se aíslan e insertan en uno o más vectores para clonación adicional y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos

convencionales. En una realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Pueden usarse métodos bien conocidos en la técnica para los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento) junto con señales de control transcripcional/traduccional adecuadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento) (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la traducción. Tal como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA, o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si están presentes, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, regiones 5' y 3' no traducidas, y similares, no son parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan post- o co-traduccionalmente en las proteínas finales mediante escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido, o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya estén fusionados o no fusionados a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento) de la invención, o una variante o derivado de la misma. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal secretoria o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operativa sucede cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal modo que sitúan la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la secuencia reguladora (o las secuencias

reguladoras). Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado a esta) se "asocian operativamente" si la inducción de la función de promotor da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de la expresión de las secuencias reguladoras para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por lo tanto, una región promotora estará asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, aparte de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estos incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano intermedio, en conjunción con el intrón A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano), y retrovirus (tales como, por ejemplo, virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrado, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y globina-â de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores específicos de tejido y potenciadores, así como promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclinas inducibles por promotores). De manera similar, los expertos habituales en la materia conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y terminación de la traducción, y elementos derivados de sistemas virales (particularmente un sitio de entrada a ribosoma interno, o IRES, también citado como una secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otras características, tales como un origen de replicación, y/o elementos de integración a cromosomas, tales como repeticiones terminales largas retrovirales (LTR), o repeticiones terminales invertidas (ITR) virales adeno-asociadas (AAV).

Las regiones codificantes del polinucleótido y ácido nucleico de la presente invención pueden asociarse con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretorios o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado

por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, puede situarse el ADN que codifica una secuencia de señal cadena arriba del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células Te la invención o un fragmento de la misma. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido de señal o secuencia líder secretoria que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la materia son conscientes de que los polipéptidos secretados por células de vertebrado generalmente tienen un péptido de señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, el péptido de señal nativo, por ejemplo, se usa un péptido de señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de aquella secuencia que mantiene la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que está asociado de manera operativa con este. Como alternativa, puede usarse un péptido de señal heterólogo de mamífero o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede sustituirse con la secuencia líder del activador de plasminógeno de tejido humano (TPA) o de β-glucuronidasa de ratón.

Puede incluirse ADN que codifica una secuencia corta de proteína que puede usarse para facilitar su posterior purificación (por ejemplo, un marcador de histidina) o para asistir en el marcado de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T dentro o en los extremos del polinucleótido codificante de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento).

En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinadas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en el presente documento en relación a polinucleótidos y vectores, respectivamente. En una realización similar, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse por ingeniería genética para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención o fragmentos de las mismas. Las células hospedadoras adecuadas para replicar y para soportar la expresión de

moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T se conocen bien en la técnica. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según sea adecuado con el vector de expresión particular y pueden cultivarse grandes cantidades de células que contienen vector para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para aplicaciones clínicas. Las células hospedadoras adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o varias células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto, o similares. Por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesita la glucosilación. Después de la expresión, el polipéptido puede aislarse a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras son adecuados para clonación u hospedadores de expresión para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), y Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (vertebrados e invertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse en conjunción con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). Las células de vertebrados también pueden usarse como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles células de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono trasformada mediante SV40 (COS-7), la línea de riñón embriónico humano (células 293 o 293T tal como se describen, por ejemplo, en Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de sertoli de ratón (células TM4 tal como se describen, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (tal como se describen, por ejemplo,

en Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5, y células FS4. Otras líneas celulares de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO dhfr$^-$ (Urlaub, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003). Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal. En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, Y0, NS0, Sp20).

Se conocen tecnologías estándar en la técnica para expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende bien la cadena pesada o la cadena ligera de un dominio de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, pueden modificarse por ingeniería genética para también expresar la otra de las cadenas del anticuerpo de tal forma que el producto expresado es un anticuerpo que tiene tanto una cadena ligera como una cadena pesada.

En una realización, se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, tal como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, y recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la célula hospedadora (o medio de cultivo de la célula hospedadora).

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se fusionan genéticamente entre sí. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede diseñarse de tal modo que sus componentes se fusionen directamente entre sí o a través de una secuencia enlazadora. La composición y longitud del enlazador puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y puede ensayarse respecto de su eficacia. Los ejemplos de secuencias enlazadoras entre diferentes componentes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T se encuentran en las secuencias proporcionadas en el presente documento. También

pueden incluirse secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión si se desea, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de endopeptidasa.

En determinadas realizaciones, los uno o más restos de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T comprenden al menos una región variable de anticuerpo capaz de unirse a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte y proceder de anticuerpos de origen natural o no natural y fragmentos de los mismos. Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos de origen no natural pueden construirse usando síntesis peptídica en fase sólida, pueden producirse de manera recombinante (por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 4.186.567, por ejemplo, explorando bibliotecas combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.969.108, McCafferty).

Pueden usarse anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, dominios de unión a antígeno o regiones variables de cualquier especie animal en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios de unión a antígeno o regiones variables no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, de primate o humano. Si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T está prevista para su uso en seres humanos, puede usarse una forma quimérica del anticuerpo en la que las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. Una forma humanizada o completamente humana del anticuerpo también puede prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nº 5.565.332 de Winter). La humanización puede lograrse mediante varios métodos incluyendo, pero sin limitación (a) injerto de las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones marco conservadas y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de restos marco conservados críticos (por ejemplo, aquellos que son importantes para mantener una buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injerto solo de las regiones determinantes de la especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los restos críticos para la interacción antígeno-anticuerpo) en regiones marco conservadas y constantes humanas, o (c) trasplante de los dominios variables no humanos completos, pero "revistiéndolos" con una sección similar a humana mediante sustitución de restos superficiales. Los anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008), y se describen

adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); Patentes de los Estados Unidos Nº 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (que describe la "reformación de superficies"); Dall'Acqua et al., Methods 36, 43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn et al., Methods 36, 61-68 (2005) y Klimka et al., Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen de manera general en van Dijk y van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) y Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos producidos por el método de hibridoma (véase, por ejemplo, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Los anticuerpos humanos y regiones variables humanas pueden prepararse también administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a provocación antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas también pueden generarse aislando secuencias de región variable de clon de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos derivadas de seres humanos (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al. en Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)). El fago presenta típicamente fragmentos de anticuerpo, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab.

En determinadas realizaciones, los restos de unión a antígeno útiles en la presente invención se diseñan para que tengan afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los métodos divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0132066, cuyo contenido íntegro se incorpora al presente documento a modo de referencia. La capacidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención para unirse a un determinante antigénico específico puede medirse bien a través de un ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la

materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), y los ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compita con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular, por ejemplo, un anticuerpo que compite con el anticuerpo V9 por la unión a CD3. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) al que se une el anticuerpo de referencia. Los métodos ilustrativos detallados para mapear un epítopo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competición ejemplar, se incuba antígeno inmovilizado (por ejemplo, CD3) en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo, anticuerpo V9, descrito en el documento US 6.054.297) y un segundo anticuerpo que se esté ensayando para su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba un antígeno inmovilizado en una solución que comprende al primer anticuerpo marcado pero no al segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad del marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo en relación a la muestra de control, esto indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T preparadas tal como se describe en el presente documento pueden purificarse mediante técnicas conocidas en la materia, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, hidrofobicidad, hidrofilidad etc., y serán evidentes para los expertos en la materia. Para la purificación por cromatografía de afinidad puede usarse un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención, puede usarse una matriz con

proteína A o proteína G. Pueden usarse cromatografía de afinidad a proteína A o G secuencial y cromatografía de exclusión por tamaño para aislar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede determinarse mediante cualquiera de una diversidad de métodos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis en gel, cromatografía líquida de alta presión, y similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión de cadena pesada expresadas tal como se describen en los Ejemplos demostraron ser intactas y ensamblarse correctamente tal como se demuestra mediante SDS-PAGE reductora (véase, por ejemplo, la figura 2). Se resolvieron tres bandas a aproximadamente PM 25.000, PM 50.000 y PM 75.000, correspondientes a los pesos moleculares predichos de la cadena ligera, la cadena pesada y la proteína de fusión de cadena pesada/cadena ligera de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T.

Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento pueden identificarse, seleccionarse, o caracterizarse según sus propiedades físicas y químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

Puede determinarse la afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T por un receptor de Fc o por un antígeno diana de acuerdo con los métodos expuestos en los ejemplos mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación convencional, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana tales como las que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Como alternativa, puede evaluarse la unión de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T a diferentes receptores o antígenos diana usando líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). Una realización ilustrativa y ejemplar para medir la afinidad de unión se describe a continuación y más adelante en los ejemplos.

De acuerdo con una realización, la K_D se mide mediante resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

Para analizar la interacción entre la parte Fc y los receptores de Fc, se captura receptor de Fc recombinante marcado con His mediante un anticuerpo anti-penta His ("Penta His", divulgado como SEC ID Nº: 306) (Qiagen) inmovilizado sobre

microplacas CM5 y las construcciones biespecíficas se usan como analitos. En resumen, se activan microplacas de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se disuelve anticuerpo anti-penta His ("Penta His", divulgado como SEC ID Nº: 306) con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, a 40 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para lograr aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Posteriormente, el receptor Fc se captura durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las medidas cinéticas se inyectan diluciones en serie de cuatro veces de la construcción biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.
Para determinar la afinidad al antígeno diana, se capturan construcciones biespecíficas mediante un anticuerpo específico anti Fab humano (GE Healthcare) que se inmoviliza sobre una superficie de microplaca sensora CM5 activada tal como se describe para el anticuerpo anti penta-His ("Penta His", divulgado como SEC ID Nº: 306). La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000 UR. Las construcciones biespecíficas se capturan durante 90 s a 300 nM. Se hacen pasar los antígenos diana a través de las celdas de flujo durante 180 s a un intervalo de concentración desde 250 hasta 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. La disociación se controla durante 180 s.
Se corrigen las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Se usó la respuesta de estado estacionario para derivar la constante de disociación K_D mediante ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (programa de evaluación BIACORE® versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

Puede medirse la actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención mediante diversos ensayos, tal como se describe en los ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de la proliferación de células T, la inducción de la señalización en células T, la inducción de marcadores de activación en células T, la inducción de la secreción de citocinas por células T, la inducción de la lisis de células diana, tales

como células tumorales, y la inducción de la regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y rutas de administración

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos siguientes. En una realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

Además se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en una forma adecuada para su administración *in vivo*, comprendiendo el método (a) obtener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, y (b) formular la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, mediante el cual se formula una preparación de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para su administración *in vivo*.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T disueltas o dispersas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que generalmente no son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporada al presente documento por referencia. Además, para administración animal (por ejemplo, a seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, tal como requiere la Agencia de Estándares biológicos de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferidas son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye a cualquiera y a todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterias, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizantes de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tintes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como sabrá un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329, incorporado al presente documento por referencia). Excepto en el caso de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol, y de si necesita ser estéril para dichas vías de administración tales como inyección. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la presente invención (y cualquier agente terapéutico adicional) pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intraesplénica, intrarrenal, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntiva, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando a las células diana directamente, a través de un catéter, mediante una lavativa, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o mediante otro método o cualquier combinaciones de los anteriores como sabrán los expertos habituales en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado al presente documento por referencia). La administración parenteral, en particular, la inyección intravenosa, se usa de manera más común para administrar moléculas polipeptídicas, tales como las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención.

Las composiciones parenterales incluyen aquellas diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes formulatorios, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados a continuación, según sea necesario. Puede lograrse fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsiones, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o criodesecación que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido esterilizado por filtración del mismo. El medio líquido debe estar tamponado de manera adecuada en caso necesario y el diluyente líquido se hará primeramente isotónico antes de la inyección con suficiente suero salino o glucosa. La composición tiene que ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse al mínimo a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo

glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener compuestos que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano, o similares. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones elevadamente concentradas. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18a Ed. Mack Printing Company, 1990). Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen al polipéptido, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. En realizaciones particulares, puede lograrse la absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso de agentes que retrasen la absorción en las composiciones, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células También pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de larga duración pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite adecuado) o resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden fabricarse

mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional en uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de las proteínas en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden formularse en una composición en una forma de ácido o base libre, neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que mantienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteinácea, o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico o ácido mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también puede derivarse a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienen a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

Métodos terapéuticos y composiciones

Puede usarse cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento en métodos terapéuticos. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden usarse como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

Para su uso en métodos terapéuticos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden formularse, dosificarse y administrarse de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios.

En un aspecto, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención para su uso en el tratamiento de una

enfermedad. En determinadas realizaciones, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención para su uso en un método de tratamiento. En una realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesita. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T. En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente anticáncer si la enfermedad que va a tratarse es cáncer. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T tal como se describe en el presente documento para su uso en la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para su uso en un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tenga la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En una realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente anticáncer si la enfermedad que va a tratarse es cáncer. En una realización adicional, el medicamento es para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En una realización adicional más, el medicamento es para su uso en un método para inducir

la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. En una realización se administra una composición a dicho individuo que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente anticáncer si la enfermedad que va a tratarse es cáncer. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En una realización, el método comprende poner en contacto una célula diana con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en presencia de una célula T, en particular de linfocitos T citotóxicos. En un aspecto adicional, se proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo. En una realización similar, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para inducir la lisis de una célula diana. En una realización, un "individuo" es un ser humano.

En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo, particularmente cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer sanguíneo, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer óseo, y cáncer de riñón. Otros trastornos de la proliferación celular que pueden tratarse usando una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la presente invención incluyen, pero sin limitación, neoplasias localizadas en: el abdomen, huesos, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas

endocrinas (adrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica, y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis cancerosas. En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de células renales, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que en muchos casos la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede no proporcionar una cura, sino solo proporcionar un beneficio parcial. En algunas realizaciones, también se considera terapéuticamente beneficioso un cambio fisiológico que tenga cierto beneficio. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se considera que una cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que proporciona un cambio fisiológico es una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunas realizaciones, se administra a una célula una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. En otras realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención a un individuo para el tratamiento de enfermedades.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención (cuando se usa sola o en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, de la vía de administración, del peso corporal del paciente, del tipo de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se administra con fines preventivos o terapéuticos, de intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, del historial clínico del paciente y de la respuesta a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, y del criterio del médico tratante. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de ingrediente activo (o ingredientes activos) en una composición y la dosis adecuada para el sujeto individual. Se contemplan en el presente documento varias pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitación a administraciones individuales o múltiples a lo largo de varios instantes, administración de bolo e infusión pulsada.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de

tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg10 mg/kg) de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede ser una dosis inicial posible para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/g a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento será generalmente sostenido hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos ni limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de los anteriores. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc. basándose en los números descritos anteriormente. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se puede administrar al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T). Se puede administrar una dosis inicial más elevada, seguida por una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas

y ensayos convencionales.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención se usarán generalmente en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. Para su uso en el tratamiento o prevención de una patología, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos.

Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, *por ejemplo,* modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en la materia. Un experto habitual en la materia podrá fácilmente optimizar la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para su administración mediante inyección están en el intervalo de 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Los niveles en plasma terapéuticamente eficaces pueden lograrse administrando múltiples dosis cada día. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por HPLC.

En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto habitual en la materia será capaz de optimizar dosis locales terapéuticamente eficaces sin experimentación innecesaria.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T descritas en el presente documento proporcionarán generalmente un beneficio terapéutico sin causar una toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivo o en animales experimentales. Los ensayos en cultivo celular y estudios en animales pueden

usarse para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50}. Se prefieren moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que muestren altos índices terapéuticos. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la presente invención muestra un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. La dosificación se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, el estado del sujeto, y similares. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, cap. 1, pág. 1, incorporada en este documento por referencia en su totalidad).

El médico tratante de pacientes tratados con moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención sabrá cómo y cuando terminar, interrumpir, o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica, y similares. Por el contrario, el médico tratante también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el control del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección a tratar, con la vía de administración, y similares. La gravedad de la afección puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, por medio de métodos de evaluación pronósticos estándar. Además, la dosis y quizá la frecuencia de la dosis también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal, y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden administrarse en combinación con otros uno o más agentes en terapia. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. La expresión "agente terapéutico" abarca cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesite dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender

cualquier principio activo adecuado para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular, o un agente que aumenta la sensibilidad de las células a inductores de la apoptosis. En una realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente anticáncer, por ejemplo, un disruptor de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, un intercalador de ADN, un agente alquilante, una terapia hormonal, un inhibidor de cinasas, un antagonista de receptores, un activador de la apoptosis de células tumorales, o un agente anti-angiogénico.

Dichos otros agentes están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el fin previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T empleada, del tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T se usan generalmente en las mismas dosis y con rutas de administración como las descritas en el presente documento, o a aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es adecuada.

Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en composiciones separadas), y administrarse por separado, en cuyo caso, la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención puede suceder antes de, de manera simultánea, y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden usarse en combinación con radioterapia.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31 para su uso en combinación con un anticuerpo para PD-L1 o FAP-4-1BBL. En una realización, este anticuerpo biespecífico comprende además un tercer sitio de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), suero salino tamponado con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Ejemplos

Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular el ADN tal como se describen en Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos moleculares biológicos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general referente a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria convencional en Synergene (Shlieren).

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados necesarios se generaron bien por PCR usando moldes adecuados o se sintetizaron por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automatizada. En los casos donde no estaba disponible una secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos basándose en las secuencias a partir de los homólogos más cercanos y los genes se aislaron mediante RT-PCR a partir del ARN originado a partir del tejido adecuado. Los segmentos génicos flaqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares se clonaron en vectores de clonación/secuenciación estándar. El ADN de plásmido se purificó a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración mediante espectroscopía UV. La secuencia de ADN de los fragmentos génicos succionados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los segmentos génicos se diseñaron con sitios de restricción adecuados para permitir la sub-clonación en los vectores de expresión respectivos. Todas las construcciones se diseñaron con una secuencia de ADN de extremo 5' que codificaba un péptido líder que dirige a las proteínas para su secreción en células eucariotas.

Aislamiento de pan células T primarias a partir de PBMC

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de bancos de sangre locales o a partir de sangre fresca de donantes humanos sanos. En resumen, se diluyó la sangre con PBS estéril y se dispuso cuidadosamente en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, H8889). Después de centrifugar durante 30 minutos a 450 x g a temperatura ambiente (freno desconectado), se desechó parte del plasma sobre la interfase que contenía PBMC. Las PBMC se transfirieron a tubos Falcon nuevos de 50 ml y se rellenaron los tubos con PBS hasta un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 x g (freno conectado).

Se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 350 x g). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640, que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en el incubador hasta el comienzo del ensayo.

El enriquecimiento en células T a partir de PBMC se llevó a cabo usando el kit Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec n.º 130-091-156), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sedimentos celulares se diluyeron en 40 µl de tampón frío por cada 10 millones de células (PBS con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM, esterilizado por filtración) y se incubaron con 10 µl de cóctel de anticuerpo-biotina por cada 10 millones de células durante 10 min a 4 °C. Se añadieron 30 µl de tampón frío y 20 µl de perlas magnéticas anti-biotina por cada 10 millones de células, y la mezcla se incubó durante otros 15 min a 4 °C. Las células se lavaron añadiendo 10-20x el volumen actual y una etapa posterior de centrifugación a 300 x g durante 10 min. Se resuspendieron hasta 100 millones de células en 500 µl de tampón. La separación magnética de pan células T humanas no marcadas se llevó a cabo usando columnas LS (Miltenyi Biotec n.º 130-042-401) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de células T resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio AIM-V a 37 °C, CO_2 al 5 % en el incubador hasta el comienzo del ensayo (no más de 24 h).

Aislamiento de células T primarias no expuestas previamente a partir de PBMC

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de bancos de sangre locales o a partir de sangre fresca de donantes humanos sanos. El enriquecimiento en células T a partir de PBMC se llevó a cabo usando el kit de aislamiento de células T $CD8^+$ no expuestas previamente de Miltenyi Biotec (n.º 130-093-244), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero omitiendo la última etapa de aislamiento de células T $CD8^+$ (véase también la descripción para el aislamiento de células T primarias humanas).

Aislamiento de pan células T murinas a partir de esplenocitos

Se aislaron bazos de ratones C57BL/6, se transfirieron a un tubo GentleMACS C (Miltenyi Biotech n.º 130-093-237) que contenía tampón MACS (PBS + BSA al 0,5 % + EDTA 2 mM) y se disociaron con el disociador GentleMACS para obtener suspensiones de células individuales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se hizo pasar la suspensión celular a través de un filtro de pre-separación

para eliminar las partículas de tejido no disociadas restantes. Después de la centrifugación a 400 x g durante 4 min a 4 °C, se añadió tampón de lisis ACK a los glóbulos rojos lisados (incubación durante 5 min a temperatura ambiente). Las células restantes se lavaron con tampón MACS dos veces, se contaron y se usaron para el aislamiento de pan células T murinas. La selección negativa (magnética) se llevó a cabo usando el kit Pan T Cell Isolation de Miltenyi Biotec (n.º 130-090-861), siguiendo las instrucciones del fabricante. La población de células T resultante se contó de manera automática (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos posteriores.

Aislamiento de PBMC de cinomolgo primarios a partir de sangre heparinizada

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación de densidad a partir de sangre fresca de donantes de cinomolgo sanos, del modo siguiente: Se diluyó la sangre heparinizada a 1:3 con PBS estéril, y se diluyó medio Lymphoprep (Axon Lab n.º 1114545) al 90 % con PBS estéril. Se dispusieron en capas dos volúmenes de la sangre diluida sobre un volumen del gradiente de densidad diluido y se separó la fracción de PBMC mediante centrifugación durante 30 min a 520 x g, sin frenada, a temperatura ambiente. La banda de PBMC se transfirió a un tubo Falcon nuevo de 50 ml y se lavó con PBS estéril mediante centrifugación durante 10 min a 400 x g a 4 °C. Se llevó a cabo una centrifugación a baja velocidad para eliminar los sedimentos (15 min a 150 x g, 4 °C), y la población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos posteriores.

Ejemplo 1

Purificación de fusiones de receptor de folato-Fc

Para generar nuevos anticuerpos contra FolR1 humano se crearon los siguientes antígenos y herramientas de exploración como proteínas de fusión a Fc monovalente (el dominio extracelular del antígeno unido a la región bisagra de Fc-pomo que se expresa conjuntamente con una molécula Fc-agujero). Se sintetizaron los genes del antígeno (Geneart, Regensburg, Alemania) basándose en las secuencias obtenidas de GenBank o SwissProt y se insertaron en vectores de expresión para generar proteínas de fusión con Fc-pomo con un marcador Avi C-terminal para la biotinilación *in vivo* o *in vitro*. La biotinilación *in vivo* se logró mediante la expresión conjunta del gen birA bacteriano que codifica una ligasa de biotina bacteriana durante la producción. La expresión de todos los genes estuvo bajo el control de un promotor MPSV quimérico en un plásmido que contenía un elemento oriP para el

mantenimiento estable de los plásmidos en líneas celulares que contenían EBNA.

Para la preparación de las moléculas de fusión de antígeno monomérico/Fc biotiniladas, se transfectaron de manera conjunta células HEK293 EBNA en suspensión que crecían de manera exponencial con tres vectores que codificaban los dos componentes de la proteína de fusión (cadenas de pomo y agujero) así como BirA, una enzima necesaria para la reacción de biotinilación. Los vectores correspondientes se usaron a una relación de 9,5: 9,5: 1 ("ECD de antígeno- Fc pomo-marcador avi": "Fc agujero": "BirA").

Para la producción de proteína, en matraces agitados de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 g, y se reemplazó al sobrenadante por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se resuspendieron en 20 ml de medio CD CHO que contenía 200 µg de ADN de vector. Después de la adición de 540 µl de polietilenimina (PEI), la solución se mezcló durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadieron ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % (Lonza) al cultivo. El medio de producción también se suplementó con biotina 100 µM. Después de 7 días de cultivo, el sobrenadante celular se recogió mediante eliminación por centrifugación de las células durante 15 min a 210 g. La solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm), se suplementó con azida de sodio hasta una concentración final del 0,01 % (p/v), y se mantuvo a 4 °C.

Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap ProteinA HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína unida se eluyó usando un gradiente de pH lineal creado en 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Entonces se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de

sodio 140 mM, pH 6,0.

La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de la fusión FolR1-Fc se analizó mediante electroforesis de capilaridad en SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). El contenido agregado de las muestras se analizó usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada con K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C.

Las proteínas de fusión antígeno-Fc purificadas se analizaron mediante ensayos de resonancia de plasmón superficial usando anticuerpos disponibles comercialmente para confirmar la conformación correcta y natural de los antígenos (datos no mostrados).

Tabla 1: Antígenos producidos para el aislamiento, selección y contraselección de anticuerpos de FolR1 humano

Antígeno	**ECD (aa)**	**Número de referencia**	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
FolR1 humano	25 - 234	P15328	RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPED KLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKD VSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDT CLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVL NVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNW HKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYF PTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCI QMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM	227
FolR2 humano	17 - 230	P14207	TMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKPG PEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQEL HKDTSRLYNFNWDHCGKMEPACKRHFI QDTCLYECSPNLGPWIQQVNQSWRKE RFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCK SNWHRGWDWTSGVNKCPAGALCRTF ESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSRG SGRCIQMWFDSAQGNPNEEVARFYAA AMHVN	228
FolR3	24 - 243	P41439	SARARTDLLNVCMNAKHHKTQPSPEDE	229

Antígeno	**ECD (aa)**	**Número de referencia**	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
humano			LYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWIRQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSFKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVAKFYAAAMNAGAPSRGIIDS	
FolR1 murino	25 - 232	P35846	TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNSCCSTNTSQEAHKDISYLYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDVPLCKEDCQQWWEDCQSSFTCKSNWHKGWNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTSAALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAEAMS	230
FolR1 decinomolgo	25 - 234	G7PR14	EAQTRTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCERWWEDCRTSYCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMS	231

Tabla 2: Resumen del rendimiento y contenido final de monómero de las fusiones FolR1-FC.

Antígeno	**Monómero [%] (SEC)**	**Rendimiento**
huFolR1	100	30 mg/l
cyFolR1	100	32 mg/l

muFolR1	100	31 mg/l
huFolR2	100	16 mg/l
huFolR3	95	38 mg/l

Ejemplo 2

Generación de cadena ligera común con especificidad de CD3ε

Las moléculas biespecíficas activadoras de células T descritas en el presente documento comprenden al menos un resto de unión a CD3. Este resto puede generarse inmunizando a animales de laboratorio, explorando fagotecas o usando anticuerpos anti-CD3 conocidos. La cadena ligera común con especificidad de CD3ε se generó humanizando la cadena ligera de un anticuerpo progenitor murino anti-CD3ε (CH2527). Para la humanización de un anticuerpo de origen no humano, los restos de CDR del anticuerpo no humano (donante) tienen que trasplantarse a la región marco conservada de un anticuerpo humano (aceptor). En general, las secuencias marco conservadas aceptoras se seleccionan alineando la secuencia del donante a una colección de secuencias aceptoras potenciales y seleccionando una que tenga bien una homología razonable con el donante, o bien que muestre aminoácidos similares en algunas posiciones críticas para la estructura y actividad. En el presente caso, la búsqueda de la región marco conservada aceptora de anticuerpo se llevó a cabo alineando la secuencia de dominio VL de ratón del anticuerpo parental con una colección de secuencias de línea germinal humana y seleccionando la secuencia humana que mostró una elevada identidad de secuencia. Sorprendentemente, se encontró una buena coincidencia en cuanto a homología de secuencia marco conservada en una cadena ligera humana bastante infrecuente perteneciente a la familia 7 de dominio V de tipo lambda, más precisamente, hVL_7_46 (nomenclatura IMGT, n.º de referencia de GenBank Z73674). Esta cadena ligera humana infrecuente se seleccionó posteriormente como región marco conservada aceptora para la humanización de la cadena ligera de CH2527. Las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del dominio variable de cadena ligera de ratón se injertaron en esta región marco conservada aceptora. Ya que la región marco conservada 5 no es parte de la región variable del gen V de línea germinal, el alineamiento para esta región (elemento J) se efectuó de manera individual. De este modo se seleccionó la secuencia IGLJ3-02 para la humanización de esta cadena ligera.

Se generaron trece variantes humanizadas (CH2527-VL7_46-1 a VL7_46-10,

VL7_46-12 a VL7_46-14). Estas difieren en los restos marco conservados (y combinaciones de los mismos) que se retromutaron a la secuencia de dominio V murina o en restos de CDR (definición de Kabat) que pudieron mantenerse idénticos a la secuencia de línea germinal humana. Se retromutaron los siguientes restos marco conservados fuera de las CDR a los restos murinos en la variante de dominio VL humanizada final VL7_46-13 (restos murinos listados): V36, E38, F44, G46, G49, y G57, respectivamente. El elemento J humano IGLJ3-02 fue 100 % idéntico al elemento J del anticuerpo progenitor murino.

Ejemplo 3

Evaluación por SPR de variantes humanizadas con especificidad por CD3ε

Se evaluaron las variantes de VL humanizadas como quimeras en un formato clásico 2+1 (figura 1D), es decir, los dominios V de cadena ligera humanizados se emparejaron con dominio V de cadena pesada murina. La evaluación por SPR se llevó a cabo en un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Más precisamente, las variantes se capturaron directamente del sobrenadante de cultivo en una microplaca sensora GLM derivatizada anti-Fab (IgG de cabra anti-humano, específica de fragmento $F(ab')_2$, Jackson ImmunoResearch) en orientación vertical. Los analitos siguientes se inyectaron posteriormente de manera horizontal como concentraciones individuales para evaluar la unión a CD3ε de humano y de cinomolgo: 3 µM de hu CD3ε(-1-26)-Fc(pomo)-avi (ID807) y 2,5 µM cy CD3ε-(-1-26)-Fc(pomo)-Avi-Fc(agujero) (ID873), respectivamente. Las respuestas de unión se compararon cuantitativamente a la unión de la construcción murina de control y se graduaron como + (unión comparable observada), +/- (unión reducida observada) y – (sin unión observada). El anticuerpo de captura se regeneró después de cada ciclo de captura de ligando y unión de ligando y se volvió a inyectar la construcción murina al final del estudio para confirmar la actividad de la superficie de captura. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Variante VL humanizadada	Unión a CD3ε
murine_CH2527-VL	+
CH2527-VL7_46-1	-
CH2527-VL7_46-2	-
CH2527-VL7_46-3	-
CH2527-VL7_46-4	-
CH2527-VL7_46-5	-
CH2527-VL7_46-6	-
CH2527-VL7_46-7	-
CH2527-VL7_46-8	-
CH2527-VL7_46-9	-
CH2527-VL7_46-10	-
CH2527-VL7_46-12	+/-
CH2527-VL7_46-13	**+**
CH2527-VL7_46-14	-

Tabla 3 Evaluaciones de unión cualitativas basadas en SPR para las variantes de cadena ligera humanizada combinadas con la cadena pesada murina de CH2527. Finalmente solo se seleccionó la variante de cadena ligera humanizada, CH2527-VL7_46-13, remarcada con letras en negrita, que mostró unión comparable a CD3ε de humano y de cinomolgo.

Ejemplo 4

Propiedades de la cadena ligera común humanizada con especificidad de CD3ε

La variante de dominio V de cadena ligera que se seleccionó para la molécula principal humanizada es VL7_46-13. Se determinaron tres grados de humanidad, es decir, la homología de secuencia del dominio V humanizado con la secuencia de dominio V de línea germinal humana. Para VL7_46-13, la identidad de secuencia general con el homólogo más próximo de línea germinal humana es del 65 % antes de la humanización y del 80 % posteriormente. Omitiendo las regiones CDR, la identidad de secuencia es del 92 % con el homólogo de línea germinal humana más próximo. Como puede observarse a partir de la tabla 3, VL7_46-13 es la única variante de VL humanizada de un panel de 13 variantes que mostraron unión comparable a la del anticuerpo murino progenitor y también retuvo su reactividad cruzada con CD3ε de cinomolgo. Este resultado indica que no fue trivial humanizar el dominio VL murino sin perder la afinidad de unión a CD3ε, que requería varias retromutaciones a restos marco conservados murinos (en particular, G46) mientras que se mantenía G24 en la CDR1. Además, este resultado muestra que el dominio

VL desempeña un papel crucial en el reconocimiento de diana. De manera importante, el dominio VL humanizado VL7_46-13 basado en una línea germinal humana infrecuente perteneciente a la familia 7 de dominio V de tipo lambda y que mantiene afinidad y especificidad por CD3ε, también es adecuado para su uso como cadena ligera común en bibliotecas de presentación en fagos del formato Fab y permite una selección satisfactoria de nuevas especificidades que facilitan en gran medida la generación y producción de moléculas biespecíficas que se unen a CD3ε y, por ejemplo, una diana tumoral y que comparten la misma cadena ligera "común".

Ejemplo 5

Generación de una biblioteca de anticuerpos presentada en fagos usando una cadena ligera común de línea germinal humana procedente de HVK1-39

Varias estrategias para generar anticuerpos biespecíficos que se asemejan a IgG humanas de longitud completa utilizan modificaciones en la región Fc que inducen la heterodimerización de dos cadenas pesadas distintas. Dichos ejemplos incluyen tecnologías de pomos en agujeros (Merchan et al., Nat Biotechnol. jul 1998;16(7):677-81) SEED (Davis et al., Protein Eng Des Sel. abr 2010;23(4):195-202) y de direccionamiento electrostático (Gunasekaran et al., J Biol Chem. 18 de jun 2010;285(25):19637-46). Aunque estas estrategias permiten la heterodimerización eficaz de dos cadenas pesadas distintas, el emparejamiento adecuado de cadenas ligeras y pesadas afines sigue siendo un problema. El uso de una cadena ligera común (LC) puede resolver este problema (Merchant, et al. Nat Biotech 16, 677-681 (1998)).

En este caso se describe la generación de una biblioteca de anticuerpos para su presentación en un fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común"). Esta biblioteca se diseñó para generar anticuerpos multiespecíficos sin necesidad de usar tecnologías sofisticadas para evitar el mal emparejamiento de la cadena ligera.

Mediante el uso de una cadena ligera común, puede facilitarse la producción de estas moléculas y ya no aparece un mal emparejamiento y se facilita el aislamiento de un anticuerpo biespecífico altamente puro. En comparación con otros formatos, el uso de fragmentos Fab como bloques de construcción en contraposición a, por ejemplo, el uso de fragmentos scFv da como resultado una mayor estabilidad térmica y la ausencia de agregación de scFv y la formación de scFv intermoleculares.

Generación de la biblioteca

A continuación se describe la generación de una biblioteca de anticuerpo para la presentación en fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común").

Se usaron las siguientes cadenas pesadas en la biblioteca (números de referencia de GenBank entre paréntesis):

IGHV1-46*01 (X92343) (SEC ID Nº: 104),

IGHV1-69*06 (L22583), (SEC ID Nº: 105)

IGHV3-15*01 (X92216), (SEC ID Nº: 106)

IGHV3-23*01 (M99660), (SEC ID Nº: 107)

IGHV4-59*01 (AB019438), (SEC ID Nº: 108)

IGHV5-51*01 (M99686), (SEC ID Nº: 109)

Todas las cadenas pesadas usan IGHJ2 como elemento J, salvo IGHV1-69*06 que usa la secuencia IGHJ6. El diseño de la aleatorización incluyó la CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3. Para CDR-H1 y CDR-H2 se seleccionó una estrategia de aleatorización "leve", y los oligonucleótidos de aleatorización fueron tales que el codon para el aminoácido de la secuencia de línea germinal estaba presente al 50 %. Todos los demás aminoácidos, a excepción de cisteína, sumaron hasta el 50 % restante. En CDR-H3, donde no había aminoácidos de línea germinal debido a la presencia del elemento genético D, se diseñaron oligonucleótidos que permiten el uso de inserciones aleatorizadas entre el elemento V y el elemento J de 4 a 9 aminoácidos de longitud. Estos oligonucleótidos estaban contenidos en su parte aleatorizada, por ejemplo. Tres aminoácidos G/Y/S estaban presentes al 15 % cada uno, los aminoácidos A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E estaban presentes al 4,6 % cada uno.

Los métodos ejemplares para la generación de bibliotecas de anticuerpos se describen en Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133-413; Lee et., al J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073-1093.

La cadena ligera procede de la secuencia humana hVK1-39, y se usa de manera no modificada y no aleatorizada. Esto asegura que pueda usarse la misma cadena ligera para otros proyectos sin modificaciones adicionales.

Selección de biblioteca ejemplar:

Las selecciones con todas las bibliotecas de maduración por afinidad se llevan a cabo en solución de acuerdo con el siguiente procedimiento usando un dominio extracelular monomérico y biotinilado de un antígeno X diana.

1. Se unen 10^12 partículas de fagémido de cada biblioteca a 100 nM de antígeno soluble biotinilado durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml. 2. El antígeno biotinilado se captura y las partículas de fago unidas específicamente se aíslan mediante la adición de ~5 x 10^7 perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina

durante 10 min. 3. Las perlas se lavan usando 1 ml de PBS/Tween20 5-10x y 1 ml de PBS 5-10x. 4. La elución de las partículas de fago se efectúa mediante la adición de 1 ml de TEA (trietilamina) 100 mM durante 10 min y la neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris 1 M/HCl pH 7,4 y 5. reinfección de las bacterias TG1 de *E. coli* en crecimiento exponencial, infección con el fago auxiliar VCSM13 y se aplica posteriormente precipitación de PEG/NaCl de las partículas de fagémido en las rondas de selección posteriores. Las selecciones se llevan a cabo en 3-5 rondas usando concentraciones de antígeno constantes o menguantes (de 10^-7 a 2 x 10^-9 M). En la ronda 2, se efectúa la captura de complejos antígeno/fago usando placas de neutravidina en lugar de perlas de estreptavidina. Todas las reacciones de unión se suplementan bien con albúmina de suero bovino 100 nM, o con leche en polvo desgrasada para que compita con clones no deseados por la simple unión adhesiva de los anticuerpos al soporte de plástico.

Las selecciones se llevan a cabo durante tres o cuatro rondas usando concentraciones de antígeno menguantes del antígeno comenzando a 100 nM y menguando hasta 5 nM en la ronda final de selección. Las moléculas de unión específicas se definen como señales aproximadamente 5 x mayores que el fondo y se identifican mediante ELISA. Las moléculas de unión específicas se identifican mediante ELISA del modo siguiente: se recubren placas de neutravidina con 100 µl de antígeno biotinilado 10nM por pocillo. Los sobrenadantes bacterianos que contienen Fab se añaden y se detectan los Fab que se unen a través de sus marcadores Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones positivos al ELISA se expresan bacterianamente como fragmentos Fab solubles en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se someten a un experimento de exploración cinética mediante análisis por SPR usando el dispositivo ProteOn XPR36 (BioRad). Los clones que expresan Fab con las constantes de afinidad mayores se identifican y se secuencian los fagémidos correspondientes. Para la caracterización posterior, las secuencias de Fab se amplifican mediante PCR a partir del fagémido y se clonan mediante los sitios de restricción adecuados en vectores de expresión de IgG1 humana para su producción en mamíferos.

Generación de una biblioteca de anticuerpo presentada en fagos usando una cadena ligera común específica para CD3ε humanizado

En este caso se describe la generación de una biblioteca de anticuerpo para la presentación en fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común"). Esta biblioteca se diseñó para la generación de anticuerpos biespecíficos de células T inactivos que contienen Fc pero inactivos respecto a la unión a FcgR de isotipo de IgG1 P329G LALA o IgG4 SPLE PG en los que uno o dos Fab reconocen a un antígeno de superficie tumoral expresado en una célula

tumoral mientras que el resto del brazo de Fab del anticuerpo reconoce a CD3ε en una célula T.

Generación de la biblioteca

A continuación se describe la generación de una biblioteca de anticuerpo para la presentación en fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común"). Esta biblioteca se diseñó solamente para la generación de anticuerpos biespecíficos de células T inactivos que contienen Fc pero inactivos respecto a la unión a FcgR de isotipo de IgG1 P329G LALA o IgG4 SPLE PG.

Se introdujo diversidad aleatorizando oligonucleótidos solo en la CDR3 de las diferentes cadenas pesadas. Los métodos para la generación de bibliotecas de anticuerpo se conocen bien en la técnica y se describen en Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133-413; o en: Lee et., al J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073-1093).

Se usaron las siguientes cadenas pesadas en la biblioteca:

IGHV1-46*01 (X92343), (SEC ID Nº: 104)

IGHV1-69*06 (L22583), (SEC ID Nº: 105)

IGHV3-15*01 (X92216), (SEC ID Nº: 106)

IGHV3-23*01 (M99660), (SEC ID Nº: 107)

IGHV4-59*01 (AB019438), (SEC ID Nº: 108)

IGHV5-51*01 (M99686), (SEC ID Nº: 109)

Se usó la cadena ligera procedente del anticuerpo CH2527 específico de CD3ε de humano y de cinomolgo humanizado en la biblioteca: (VL7_46-13; SEC ID Nº: 112). Esta cadena ligera no se aleatorizó y se usó sin modificaciones adicionales para asegurar la compatibilidad con moléculas de unión biespecíficas diferentes.

Todas las cadenas pesadas usan IGHJ2 como elemento J, salvo IGHV1-69*06 que usa la secuencia IGHJ6. El diseño de la aleatorización se centró solo en la CDR-H3, y se diseñaron oligonucleótidos de PCR que permiten el uso de inserciones aleatorizadas entre el elemento V y el elemento J de 4 a 9 aminoácidos de longitud.

Ejemplo 6

Selección de fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas de cadena ligera común (que comprenden cadena ligera con especificidad de CD3ε) para FolR1

Los anticuerpos 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8, 19H3, 20G6, y 20H7 que comprenden la cadena ligera común VL7_46-13 con especificidad de CD3ε se obtuvieron mediante selecciones de

presentación en fagos frente a FolR1 de diferentes especies (humano, de cinomolgo y murino). Los clones 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 21D1, 16F12, 19H3, 20G6, y 20H7 se seleccionaron de una sub-biblioteca en la que la cadena ligera común se emparejó con un repertorio de cadena pesada basado en la línea germinal humana VH1_46. En esta sub-biblioteca, la CDR3 de VH1_46 se aleatorizó basándose en 6 longitudes diferentes de CDR3. Los clones 16D5, 15E12, 21A5, y 21G8 se seleccionaron de una sub-biblioteca en la que la cadena ligera común se emparejó con un repertorio de cadena pesada basado en la línea germinal humana VH3_15. En esta sub-biblioteca, la CDR3 de VH3_15 se aleatorizó basándose en 6 longitudes diferentes de CDR3. Para obtener anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con especies (o que reaccionan con FolR1 murino), se alternaron los FolR1 de diferentes especies (o se mantuvieron constantes) de diferentes maneras durante 3 ciclos de biopaneo: 16A3 y 15A1 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano); 18D3 (FolR1 de cinomolgo – humano – murino); 19E5 y 19A4 (3 ciclos frente a FolR1 murino); 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano); 19H3, 20G6, y 20H7 (3 ciclos frente a FolR1 murino).

Se expresaron de manera transitoria FolR1 de humano, murino y de cinomolgo como antígenos para las selecciones de presentación en fago así como para las exploraciones basadas en ELISA y en SPR como fusiones monoméricas N-terminales de Fc en células HEK EBNA e *in vivo* biotinilados en sitios específicos mediante la expresión conjunta de la ligasa de biotina BirA en la secuencia de reconocimiento del marcador avi situada en el extremo C-terminal de la parte Fc que porta la cadena de receptor (cadena Fc de pomo). Para evaluar la especificidad para FolR1, se generaron dos receptores relacionados, FolR2 y FolR3 humanos, del mismo modo.

Las rondas de selección (biopaneo) se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente patrón:

1. Pre-eliminación de ~ 10^{12} partículas de fagémido en placas maxisorp recubiertas con 10 µg/ml de una IgG humana no relacionada para empobrecer las bibliotecas de anticuerpos que reconocen la porción Fc del antígeno.

2. Incubación de las partículas de fagémido no de unión a Fc con 100 nM de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado durante 0,5 h en presencia de construcción de Fc de pomo en agujero no biotinilada no relacionada para la eliminación adicional de moléculas de unión a Fc en un volumen total de 1 ml.

3. Captura del FolR1 biotinilado y unido específicamente al fago de unión mediante transferencia a 4 pocillos de una placa de microtitulación pre-recubierta con

neutravidina durante 10 min (en las rondas 1 y 3).

4. Lavado de los pocillos respectivos usando PBS/Tween20 5x y PBS 5x.

5. Elución de las partículas de fago mediante la adición de 250 µl de TEA (trietilamina) 100 mM por pocillo durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris/HCl 1 M, pH 7,4 a las eluciones agrupadas de 4 pocillos.

6. Eliminación posterior de las eluciones neutralizadas mediante incubación en placa de microtitulación recubierta previamente con neutravidina con 100 nM de FolR2 o FolR3 capturado en biotina para la eliminación final de moléculas de unión a Fc y no específicas.

7. Re-infección de células TG1 de *E. coli* en fase logarítmica con el sobrenadante de las partículas de fago eluidas, infección con el fago auxiliar VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante toda una noche y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido para su uso en la siguiente ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo a lo largo de 3 rondas usando concentraciones de antígeno constante de 100 nM. En la ronda 2, para evitar el enriquecimiento de moléculas de unión a avidina, la captura de complejos de antígeno:fago se llevó a cabo mediante la adición de 5,4 x 10^7perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las moléculas de unión específicas se identificaron mediante ELISA del modo siguiente: Se recubrieron 100 µl de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado 25 nM y 10 µg/ml de IgG humana sobre placas de neutravidina y placas maxisorp, respectivamente. Los sobrenadantes bacterianos que contenían Fab se añadieron y se detectaron los Fab que se unen a través de sus marcadores Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que muestran señales en FolR1 humano y que son negativos en IgG humana se seleccionaron para análisis posteriores y también se ensayaron de un modo similar frente a las dos especies restantes de FolR1. Se expresaron de manera bacteriana en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purificaron por afinidad y se caracterizaron adicionalmente mediante análisis de SPR usando un biosensor ProteOn XPR36 de BioRad.

Las afinidades (K_D) de los clones seleccionados se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con FolR1 de humano, cinomolgo y murino biotinilado así como FolR2 y FolR3 humano (controles negativos) inmovilizados sobre placas NLC mediante captura de neutravidina. Inmovilización de antígenos (ligando): Los antígenos recombinantes se diluyeron con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a 10 µg/ml, después se inyectaron a 30 µl/minuto en orientación vertical.

Inyección de analitos: Para las medidas "cinéticas de una dosis", se cambió la dirección de la inyección a orientación horizontal, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab purificado (intervalos de concentración variantes) de manera simultánea en los canales 1-5 separados, con tiempos de asociación de 200 s, y tiempos de disociación de 600 s. El tampón (PBST) se inyectó en el sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referencia. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon un modelo de unión de Langmuir simple de uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on}. La Tabla 4 lista las constantes de equilibrio de disociación (K_D) de los clones seleccionados específicos para FolR1.

Tabla 4: Constantes de disociación de equilibrio (K_D) para anticuerpos anti-FolR1 (formato Fab) seleccionados mediante presentación de fagos a partir de sub-bibliotecas de cadena ligera común que comprenden VL7_46-13, una cadena ligera humanizada específica para CD3ε. K_D en nM.

Clon	**huFolR1 [nM]**	**cyFolR1 [nM]**	**muFolR1 [nM]**	**huFolR2 [nM]**	**huFolR3 [nM]**
16A3	21,7	18	muy débil	sin unión	sin unión
15A1	30,9	17,3	muy débil	sin unión	sin unión
18D3	93,6	40.2	muy débil	sin unión	sin unión
19E5	522	276	19,4	sin unión	sin unión
19A4	2050	4250	43,1	sin unión	sin unión
15H7	13,4	72,5	sin unión	sin unión	sin unión
15B6	19,1	13,9	sin unión	sin unión	sin unión
16D5	39,5	114	sin unión	sin unión	sin unión
15E12	55,7	137	sin unión	sin unión	sin unión
21D1	62,6	32,1	sin unión	sin unión	sin unión
16F12	68	90,9	sin unión	sin unión	sin unión
21A5	68,8	131	sin unión	sin unión	sin unión
21G8	130	261	sin unión	sin unión	sin unión
19H3	sin unión	sin unión	89,7	sin unión	sin unión
20G6	sin unión	sin unión	78,5	sin unión	sin unión

Ejemplo 7

Selección de fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas de múltiples regiones marco conservadas genéricas para FolR1

Los anticuerpos 11F8, 36F2, 5D9, 6B6, y 14E4 se obtuvieron mediante selecciones de presentación en fagos basadas en sub-bibliotecas de múltiples regiones marco conservadas genéricas contra FolR1 de diferentes especies (humano, cinomolgo y murino). En estas sub-bibliotecas de múltiples regiones marco conservadas genéricas, se emparejan dominios VL diferentes con CDR3 aleatorizadas (3 longitudes diferentes) con diferentes dominios VH diferentes con CDR3 aleatorizadas (6 longitudes diferentes). Los clones seleccionados son de los siguientes emparejamientos VL/VH: 11F8 (Vk_1_5/VH_1_69), 36F2 (Vk_3_20/VH_1_46), 5D9 (Vk3_20/VH1_46), 6B6 (Vk3_20/VH1_46), y 14E4 (Vk3_20/VH3_23). Para obtener anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con especies (o que reaccionan con FolR1 murino), se alternaron los FolR1 de diferentes especies (o se mantuvieron constantes) de diferentes maneras durante 3 o 4 ciclos de biopaneo: 11F8 (FolR1 de cinomolgo – murino – humano); 36F2 (FolR1 humano – murino – de cinomolgo – murino); 5D9 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano); 6B6 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano) y 14E4 (3 rondas frente a FolR1 murino).

Se expresaron de manera transitoria FolR1 de humano, murino y de cinomolgo como antígenos para las selecciones de presentación en fago así como para las exploraciones basadas en ELISA y en SPR como fusiones monoméricas N-terminales de Fc en células HEK EBNA e *in vivo* biotinilados en sitios específicos mediante la expresión conjunta de la ligasa de biotina BirA en la secuencia de reconocimiento del marcador avi situada en el extremo C-terminal de la parte Fc que porta la cadena de receptor (cadena Fc de pomo). Para evaluar la especificidad para FolR1, se generaron dos receptores relacionados, FolR2 y FolR3 humanos, del mismo modo.

Las rondas de selección (biopaneo) se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente patrón:

1. Pre-eliminación de ~ 10^{12} partículas de fagémido en placas maxisorp recubiertas con 10 µg/ml de una IgG humana no relacionada para empobrecer las bibliotecas de anticuerpos que reconocen la porción Fc del antígeno.

2. Incubación de las partículas de fagémido no de unión a Fc con 100 nM de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado durante 0,5 h en presencia de construcción de Fc de pomo en agujero no biotinilada no relacionada para la eliminación adicional de moléculas de unión a Fc en un volumen total de 1 ml.

3. Captura del FolR1 biotinilado y unido específicamente al fago de unión mediante transferencia a 4 pocillos de una placa de microtitulación pre-recubierta con neutravidina durante 10 min (en las rondas 1 y 3).

4. Lavado de los pocillos respectivos usando PBS/Tween20 5x y PBS 5x.

5. Elución de las partículas de fago mediante la adición de 250 µl de TEA (trietilamina) 100 mM por pocillo durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris/HCl 1 M, pH 7,4 a las eluciones agrupadas de 4 pocillos.

6. Eliminación posterior de las eluciones neutralizadas mediante incubación en placa de microtitulación recubierta previamente con neutravidina con 100 nM de FolR2 o FolR3 capturado en biotina para la eliminación final de moléculas de unión a Fc y no específicas.

7. Re-infección de células TG1 de *E. coli* en fase logarítmica con el sobrenadante de las partículas de fago eluidas, infección con el fago auxiliar VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante toda una noche y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido para su uso en la siguiente ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo a lo largo de 3 rondas usando concentraciones de antígeno constante de 100 nM. En las rondas 2 y 4, para evitar el enriquecimiento de moléculas de unión a avidina, la captura de complejos de antígeno:fago se llevó a cabo mediante la adición de 5,4 x 10^7perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las moléculas de unión específicas se identificaron mediante ELISA del modo siguiente: Se recubrieron 100 µl de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado 25 nM y 10 µg/ml de IgG humana sobre placas de neutravidina y placas maxisorp, respectivamente. Los sobrenadantes bacterianos que contenían Fab se añadieron y se detectaron los Fab que se unen a través de sus marcadores Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que muestran señales en FolR1 humano y que son negativos en IgG humana se seleccionaron para análisis posteriores y también se ensayaron de un modo similar frente a las dos especies restantes de FolR1. Se expresaron de manera bacteriana en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purificaron por afinidad y se caracterizaron adicionalmente mediante análisis de SPR usando un biosensor ProteOn XPR36 de BioRad.

Las afinidades (K_D) de los clones seleccionados se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con FolR1 de humano, cinomolgo y murino biotinilado así como FolR2 y FolR3 humano (controles negativos) inmovilizados sobre placas NLC mediante captura de neutravidina. Inmovilización de antígenos (ligando): Los antígenos recombinantes se

diluyeron con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a 10 µg/ml, después se inyectaron a 30 µl/minuto en orientación vertical. Inyección de analitos: Para las medidas "cinéticas de una dosis", se cambió la dirección de la inyección a orientación horizontal, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab purificado (intervalos de concentración variantes) de manera simultánea en los canales 1-5 separados, con tiempos de asociación de 150 o 200 s, y tiempos de disociación de 200 o 600 s, respectivamente. Se inyectó tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referenciar. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon un modelo de unión de Langmuir simple de uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on}. La Tabla 5 lista las constantes de equilibrio de disociación (K_D) de los clones seleccionados específicos para FolR1.

Tabla 5: Constantes de disociación de equilibrio (K_D) para anticuerpos anti-FolR1 (formato Fab) seleccionados mediante presentación en fagos a partir de sub-librerías de múltiples regiones marco conservadas genéricas. K_D en nM.

	K_D (nM)				
Clon	**huFolR1**	**cyFolR1**	**muFolR1**	**huFolR2**	**huFolR3**
11F8	632	794	1200	sin unión	sin unión
36F2	1810	1640	737	sin unión	sin unión
5D9	8,6	5,29	sin unión	sin unión	sin unión
6B6	14,5	9,4	sin unión	sin unión	sin unión
14E4	sin unión	sin unión	6,09	sin unión	sin unión

Ejemplo 8

Producción y purificación de nuevas moléculas de unión a FolR1 en formatos de IgG y biespecíficos de células T

Para identificar moléculas de unión a FolR1 que son capaces de inducir la eliminación dependiente de células T de células diana seleccionadas, se convirtieron los anticuerpos aislados a partir de una cadena ligera común o biblioteca de Fab en el formato de IgG1 humano correspondiente. En resumen, las cadenas pesada variable y ligera variable de moléculas de unión a FolR1 únicas a partir de presentación en fagos se amplificaron mediante reacciones PCR convencionales usando los clones de Fab como molde. Los productos de la PCR se purificaron e

insertaron (bien mediante clonación basada en endonucleasa de restricción y ligasa, o mediante "diseño recombinante" usando el kit InFusion de Invitrogen) en vectores de expresión adecuados en los que se fusionan a las cadenas pesadas constantes humanas o cadenas ligeras constantes humanas adecuadas. Los casetes de expresión en estos vectores consisten en un promotor de MPSV quimérico y un sitio de poliadeniliación sintético. Además, los plásmidos contienen la región oriP del virus de Epstein Barr para el mantenimiento estable de los plásmidos en células HEK293 que portan el antígeno nuclear EBV (EBNA). Después de la transfección mediada por PEI, los anticuerpos se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A convencional seguido de cromatografía de exclusión por tamaño, tal como se describe:

Transfección y producción transitoria

Todos los anticuerpos (biespecíficos) (si no se obtuvieron de una fuente comercial) usados en el presente documento se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantiene a 4 °C. Después de la producción se recogen los sobrenadantes y los sobrenadantes que contienen anticuerpo se filtraron a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación de anticuerpos

Todas las moléculas se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna HiTrap PA FF (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 5 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 12 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron a 2 ml usando ultraconcentradores) Vivaspin 15R 30,000 MWCO HY, Sartorius) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Las fracciones que contenían menos de un 2 % de oligómeros se agruparon y concentraron a una concentración final de 1 - 1,5 mg/ml usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius). La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Basándose en los resultados de caracterización *in vitro* las moléculas de unión seleccionadas se convirtieron a un formato biespecífico de célula T. En estas moléculas, los restos de unión de FolR1:CD3 están dispuestos en un orden de 2:1, situándose los Fabs de FolR1 en el extremo N-terminal. Para los clones aislados a partir de la biblioteca de Fab convencional, la parte de unión a CD3 se generó como un CrossFab (cruzamiento CH1Cκ) mientras que para los clones de la biblioteca de la cadena ligera común no fue necesario el cruzamiento. Estas moléculas biespecíficas se produjeron y purificaron de manera análoga a las IgG.

Tabla 6: Rendimiento y contenido de monómero de nuevas moléculas de unión a FolR1 en formato IgG y TCB, respectivamente.

			IgG		TCB	
Nº	**Clon**	**Biblioteca**	**Rendimiento [mg/l]**	**Monómero [%]**	**rendimiento [mg/l]**	**Monómero [%]**
1	11F8	Fab	8,03	96,26	--	--
2	14E4	Fab	8,90	98,12	--	--
3	15B6	CLC	7,72	100,00	--	--
4	15E12	CLC	6,19	100,00	--	--
5	15H7	CLC	8,94	100,00	--	--
6	16A3	CLC	0,60	n.d.	--	--
7	16D5	CLC	36,50	96,96	4,36	97,19
8	16F12	CLC	5,73	97,17	--	--
9	18D3	CLC	0,90	n.d.	--	--
10	19A4	CLC	38,32	100,00	37,50	100,00
11	19E5	CLC	46,09	100,00	--	--
12	19H3	CLC	7,64	100,00	--	--
13	20G6	CLC	24,00	100,00	--	--
14	20H7	CLC	45,39	100,00	--	--
15	21A5	CLC	1,38	98,56	47,31	95,08
16	21D1	CLC	5,47	100,00	--	--
17	21G8	CLC	6,14	97,28	9,27	100,00
18	36F2	Fab	11,22	100,00	18,00	100,00
19	5D9	Fab	20,50	100,00	0,93	97,32
20	6B6	Fab	3,83	100,00	4,17	91,53

CLC: Cadena ligera común

Ejemplo 9

Formatos biespecíficos de célula T 2+1 y 1+1

Se prepararon cuatro formatos biespecíficos de célula T para una molécula de unión de cadena ligera común (16D5)) para comparar sus propiedades de eliminación *in vitro*.

El formato convencional es el formato invertido 2+1 tal como ya se ha descrito (restos de unión a FolR1:CD3 dispuestos en un orden 2:1 situándose los Fab de

FolR1 en el extremo N-terminal). En el formato 2+1 clásico, los restos de unión a FolR1:CD3 están dispuestos en un orden 2:1 situándose el Fab de CD3 en el extremo N-terminal. También se prepararon dos formatos monovalentes. El 1+1 de cabeza a cola tiene los restos de unión a FolR1:CD3 dispuestos en un orden 1:1 en el mismo brazo de la molécula, situándose el Fab de FolR1 en el extremo N-terminal. En el formato 1+1 clásico, los restos de unión a FolR1:CD3 están presentes una vez, cada uno en un brazo de la molécula. Para el clon 16D5 de la biblioteca de cadena ligera común no fue necesario el cruzamiento CH1Cκ. Estas moléculas biespecíficas se produjeron y purificaron de manera análoga al formato biespecífico de célula T invertido convencional.

Tabla 7: Resumen de rendimiento y contenido final de monómero de los diferentes formatos biespecíficos de célula T.

Construcción	**Monómero [%] (SEC)**	**Rendimiento**
TCB de FolR1 16D5 2+1 (invertido)	96 %	5,4 mg/l
TCB de FolR1 16D5 2+1 (clásico)	90 %	4,6 mg/l
TCB de FolR1 16D5 1+1 (cabeza a cola)	100 %	5,4 mg/l
TCB de FolR1 16D5 1+1 (clásico)	100 %	0,7 mg/l
TCB de FolR1 Mov19 2+1 (invertido)	98 %	3 mg/l
TCB de FolR1 Mov19 1+1 (cabeza a cola)	100 %	5,2 mg/l

Ejemplo 10

Caracterización bioquímica de moléculas de unión a FolR1 mediante resonancia de plasmón superficial

La unión de moléculas de unión a FolR1 como IgG o en el formato biespecífico de célula T a diferentes receptores de folato (FolR1, 2 y 3 humano, FolR1 murino y FolR1 de cinomolgo; todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

Inyecciones individuales

En primer lugar se analizaron las IgG anti-FolR1 mediante inyecciones individuales

(Tabla 1) para caracterizar su reactividad cruzada (con FolR1 humano, murino y de cinomolgo) y su especificidad (para FolR1 humano, FolR2 humano, FolR3 humano). Se acoplaron directamente fusiones a Fc monoméricas de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) de ser humano, cinomolgo y murino o de receptor 2 y 3 de folato humano (FolR2-Fc, FolR3-Fc) sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG se inyectaron durante 60 segundos a una concentración de 500 nM. Las IgG que se unían a huFolR2 y a huFolR3 se rechazaron por falta de especificidad. La mayoría de las moléculas de unión solo tienen reactividad cruzada entre FolR1 humano y de cinomolgo, la reactividad cruzada a FolR1 murino adicional fue la mayoría de las veces de la mano con la pérdida de especificidad.

Tabla 8: Reactividad cruzada y especificidad de 25 nuevas moléculas de unión al receptor 1 de folato (como IgG) así como de dos IgG de control (Mov19 y farletuzumab). + significa unión, - significa sin unión, +/- significa unión débil.

Nombre del clon	**Unión a huFolR1**	**Unión a cyFolR1**	**Unión a muFolR1**	**Unión a huFolR2**	**Unión a huFolR3**
Mov19	+	+	-	-	-
Farletuzumab	+	+	-	-	-
16A3	+	+	+/-	-	-
18D3	+	+	-	-	-
19E5	+	+	+	+	+
19A4	-	-	+	+	+
15H7	+	+	+	-	-
15B6	+	+	-	-	-
16D5	+	+	-	-	-
15E12	+	+	+/-	+	+
21D1	+	+	+/-	-	-
16F12	+	+	-	-	-
21A5	+	+	-	-	+/-
21G8	+	+	-	+	+
19H3	-	-	+	-	-
20G6	-	-	+	-	-
20H7	-	-	+	-	-
5D9	+	+	-	+	+
6B6	+	+	-	+	+
11F8	+	+	+	+	+

Nombre del clon	Unión a huFolR1	Unión a cyFolR1	Unión a muFolR1	Unión a huFolR2	Unión a huFolR3
36F2	+	+	+	-	-
14E4	-	-	+	-	-

Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 9).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 2,1 a 500 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 600 segundos. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2-Fc biotinilada recombinante. Para el análisis de la interacción de la IgG 19H3 y el receptor 1 de folato murino, se añadió folato (Sigma F7876) en el tampón de ejecución HBS-EP a una concentración de 2,3µM. Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las IgG o moléculas biespecíficas de células T se aproximaron a una unión de Langmuir 1:1 y se ajustó con ese modelo (lo que no es correcto, pero que da una idea de la avidez). Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 9: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano y de cinomolgo**Analito**	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente (M)**

TCB 16D5	**huFolR1**	8,31E+04	3,53E-04	4,24E-09
	cyFolR1	1,07E+05	3,70E-04	3,45E-09
TCB 21A5	**huFolR1**	2,43E+05	2,64E-04	1,09E-09
	cyFolR1	2,96E+05	2,76E-04	9,32E-10
IgG 36F2	**huFolR1**	2,62E+06	1,51E-02	5,74E-9
	cyFolR1	3,02E+06	1,60E-02	5,31E-9
	muFolR1	3,7E+05	6,03E-04	1,63E-9
IgG Mov19	**huFolR1**	8,61E+05	1,21E-04	1,4E-10
	cyFolR1	1,29E+06	1,39E-04	1,08E-10
Farletuzumab	**huFolR1**	1,23E+06	9E-04	7,3E-10
	cyFolR1	1,33E+06	8,68E-04	6,5E-10
IgG 19H3	**muFolR1**	7,1E+05	1,1E-03	1,55E-09

1. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 10).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 6000-7000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 20 o 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (6,17 a 500 nM o 12,35 a 3000 nM) de fusión Fc-receptor 1 de folato humano o de cinomolgo en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 120 o 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 240 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 2,1 o pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 10: Unión monovalente (afinidad) de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano y de cinomolgo.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
TCB 16D5	**huFolR1**	1,53E+04	6,88E-04	4,49E-08
	cyFolR1	1,32E+04	1,59E-03	1,21E-07
TCB 21A5	**huFolR1**	1,79E+04	1,1E-03	6,16E-08
	cyFolR1	1,48E+04	2,06E-03	1,4E-07
IgG Mov19	**huFolR1**	2,89E+05	1,59E-04	5,5E-10
	cyFolR1	2,97E+05	1,93E-04	6,5E-10
Farletuzumab	**huFolR1**	4,17E+05	2,30E-02	5,53E-08
	cyFolR1	5,53E+05	3,73E-02	6,73E-08

2. Afinidad a CD3

La afinidad de la interacción entre las moléculas biespecíficas de células T anti-FolR1 y el CD3εδ-Fc humano recombinante se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 11).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 9000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (6,17 a 500 nM) de fusión CD3εδ-FC en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 240 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 2,1. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 11: Unión monovalente (afinidad) de moléculas biespecíficas de célula T (TCB) de FolR1 a CD3-Fc humano.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
TCB 16D5	**huCD3**	4,25E+04	3,46E-03	8,14E-08
TCB 21A5	**huCD3**	3,72E+04	3,29E-03	8,8E-08

La parte de unión a CD3 es idéntica para todas las construcciones y la afinidad es similar para las moléculas biespecíficas de célula T medidas (intervalo de KD entre

60 y 90 nM).

Ejemplo 11

Moléculas biespecíficas de célula T de unión simultánea al receptor 1 de folato y a CD3

La unión simultánea de las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 al receptor 1 de folato y a CD3εδ-Fc humano recombinante se determinó mediante resonancia de plasmón superficial tal como se describe a continuación. Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 se inyectaron durante 60 s a 500 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo, seguido de una inyección de CDεδ-Fc humano durante 60 s a 500 nM. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2-Fc biotinilada recombinante. Las cuatro moléculas biespecíficas de célula T ensayadas (TCB 16D5, TCB 21A5, TCB 51C7 y TCB 45D2) fueron capaces de unirse simultáneamente al receptor 1 de folato y a CD3 humano, tal como se esperaba.

Ejemplo 12

Agrupamiento de epítopos

Para el agrupamiento de epítopos, las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T se inmovilizaron directamente sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare), con una respuesta final de aproximadamente 700 UR. Entonces se capturaron 500 nM de huFolR1-Fc durante 60 s, seguido de 500 nM de las diferentes moléculas de unión durante 30 s. La superficie se regeneró con dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 2 durante 30 s cada una. Se evaluó si las diferentes moléculas de unión podían unirse a huFolR1 capturado en las moléculas de unión inmovilizadas (Tabla 12).

Tabla 12: Caracterización de epítopos de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano. + significa unión, - significa sin unión, +/- significa unión débil

		Analitos en solución				
	En huFolR1	TCB 16D5	TCB 21A5	IgG 36F2	IgG Mov19	Farletuzumab
Inmovilizado	TCB 16D5	-	-	+	+	+
	TCB 21A5	-	-	+	+	+
	IgG 36F2	No es posible medir, huFolR1 se disocia demasiado rápidamente				
	IgG Mov19	+	+	-	-	-

Basándose en estos resultados y en datos adicionales con unión simultánea sobre huFolR1 inmovilizado, las moléculas de unión se separaron en dos grupos.16D5 y 21A5 parecen estar en el mismo grupo y Mov19, Farletuzumab (Coney et al., Cancer Res. 15 de noviembre de 1991;51(22):6125-32. Kalli et al., Curr Opin Investig Drugs. Dic 2007;8(12):1067-73) y 36F2 en otro (Tabla 13). Sin embargo, 36F2 se une a un epítopo distinto al de Mov19 y Farletuzumab ya que se une a FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Tabla 13: Agrupamiento de epítopos de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano

Epítopo 1	**Epítopo 2**
16D5	Mov19
21A5	Farletuzumab
	36F2

Ejemplo 13

Selección de moléculas de unión

Las moléculas de unión a FolR1 en los formatos IgG se exploraron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) y mediante ensayo *in vitro* en células para seleccionar los mejores candidatos.

Las IgG anti-FolR1 se analizaron mediante SPR para caracterizar su reactividad cruzada (con FolR1 humano, murino y de cinomolgo) y la especificidad (para FolR1 humano, FolR2 humano, FolR3 humano). La unión no específica a FolR2 y 3 humano se consideró como un factor de exclusión. La unión y especificidad por FolR1 humano se confirmó en células. Algunas moléculas de unión no se unieron a células que expresaban FolR1 aunque reconociesen a FolR1 humano recombinante en SPR. Se determinó la temperatura de agregación pero no fue un factor de exclusión ya que las moléculas de unión eran todas estables. Las moléculas de unión seleccionadas se ensayaron en un ELISA de polirreactividad para comprobar la unión no específica, lo que dio lugar a la exclusión de cuatro moléculas de unión. Este proceso dio como resultado una selección inicial de dos moléculas de unión: 36F2 (biblioteca de Fab), y 16D5 (cadena ligera común). 36F2 se disoció rápidamente de huFolR1 y, por lo tanto, no se favoreció inicialmente.

Ejemplo 14

Unión específica de moléculas de unión a FolR1 recién generadas a células tumorales positivas a FolR1 humano

Se generaron nuevas moléculas de unión a FolR1 mediante presentación en fagos usando bien una biblioteca de Fab o una biblioteca de cadena ligera común usando la cadena ligera de CD3. Las moléculas identificadas se convirtieron a un formato de IgG1 humana y se abordó la unión a células HeLa con alta expresión de FolR1. Se incluyó la molécula de unión a FolR1 humano, Mov19, como molécula de referencia. La mayoría de las moléculas de unión ensayadas en este ensayo mostraron unión de inmediata a buena a FolR1, uniéndose algunos clones igual de bien que Mov19 (véase la Figura 2). Los clones 16A3, 18D3, 15H7, 15B6, 21D1, 14E4 y 16F12 se excluyeron porque la unión a FolR1 en células no pudo confirmarse mediante citometría de flujo. En una etapa posterior, los clones seleccionados se ensayaron respecto de la especificidad por FolR1 humano excluyendo la unión a FolR2 humano estrechamente relacionado. Se transfectaron de manera transitoria células HEK con FolR1 humano o FolR2 humano para abordar la especificidad. El clon 36F2 procedente de la biblioteca de Fab y los clones 16D5 y 21A5 procedentes de la biblioteca de CLC se unen específicamente a FolR1 humano y no a FolR2 humano (véanse las figuras 3A-B). Todos los demás clones ensayados mostraron al menos cierta unión a FolR2 humano (véanse las figuras 3A-B). Por lo tanto, estos clones se

excluyeron de posteriores caracterizaciones. En paralelo, se abordó la reactividad cruzada de los clones de FolR1 a FolR1 de cinomolgo efectuando estudios de unión en células HEK transfectadas transitoriamente con FolR1 de cinomolgo. Todos los clones ensayados son capaces de unirse a FolR1 de cinomolgo y los tres clones específicos de FolR1 humano seleccionados, 36F2, 16D5 y 21A5 se unen bien de manera comparable a FoLR1 humano y de cinomolgo (figura 4). Posteriormente se convirtieron tres moléculas de unión a FolR1 humano con reactividad cruzada con cinomolgo a formato TCB y se ensayaron respecto de la inducción de eliminación por células T y activación de células T. Estos clones fueron 16D5 y 21A5 de la biblioteca de CLC. Como molécula de referencia, se incluyó el TCB de FolR1, Mov19, en todos los estudios. Estos TCB de FolR1 se usaron entonces para comparar la inducción de la internalización después de la unión a FolR1 en células HeLa. Los tres clones ensayados se internalizaron tras la unión a FolR1, comparable a la internalización tras la unión del TCB de FolR1, Mov19 (figura 5). Se dejó de usar el TCB de FolR1 21A5 debido a signos de polirreactividad.

Ejemplo 15

Eliminación mediada por células T de células diana tumorales que expresaban FolR1 mediante anticuerpos TCB de FolR1

Los TCB de FolR1 se usaron para determinar la eliminación de células tumorales que expresaban FolR1 mediada por células T. Se usó un panel de líneas celulares diana potenciales para determinar los sitios de unión a FolR1 mediante análisis Qifikit.

El panel de células tumorales usado contiene células tumorales con elevada, intermedia y baja expresión de FolR1 y una línea celular negativa a FolR1.

Tabla 14: Sitios de unión a FolR1 en células tumorales

Línea celular	**Origen**	**Sitios de unión a FolR1**
Hela	Adenocarcinoma de cuello de útero	2’240’716
Skov3	Adenocarcinoma de ovario	91’510
OVCAR5	Adenocarcinoma de ovario	22’077
HT29	Adenocarcinoma colorrectal	10’135
MKN45	Adenocarcinoma gástrico	54

La unión de los dos diferentes TCB de FolR1 (que contenían las moléculas de unión 16D5 y Mov19) a este panel de líneas celulares tumorales se determinó mostrando que los TCB de FolR1 se unen específicamente a células tumorales que expresan FolR1 y no a una línea celular tumoral negativa a FolR1. La cantidad de construcción unida es proporcional al nivel de expresión de FolR1 y sigue habiendo buena unión detectable a la línea celular HT-29 baja en FolR1. Además, no hay unión del TCB DP47 de control negativo en cualquiera de las líneas celulares usadas (figuras 6A-E).

La línea celular de expresión intermedia, SKOV3, y la línea celular de baja expresión, HT-29, se usaron posteriormente para ensayar la eliminación mediada por células T y la activación de células T usando el TCB 16D5; Se incluyó el TCB DP47 como control negativo. Ambas líneas celulares se eliminaron en presencia de niveles muy bajos de TCB 16D4. La eliminación general de células SKOV3 fue mayor en comparación con HT-29, lo que refleja los mayores niveles de expresión de FolR1 en células SKOV3 (figuras 7A-D). En línea con esto, se detectó una fuerte regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$. La activación de células T fue muy similar en presencia de células SKOV3 y células HT-29. El control negativo, TCB DP47 no induce eliminación a las concentraciones usadas y no hubo una regulación positiva significativa de CD25 y CD69 en células T.

Tabla 15: Valores de CE50 de eliminación de células tumorales y de activación de células T con células SKOV3

Construcción	**Eliminación a las 24 h (pM)**	**Eliminación a las 48 h (pM)**	**CD4+ CD69+ (%)**	**CD4+ CD25+ (%)**	**CD8+ CD69+ (%)**	**CD8+ CD25+ (%)**
TCB de FolR1 16D5	0,7	0,04	0,34	0,33	0,025	0,031

Tabla 16: Valores de CE50 de eliminación de células tumorales y de activación de células T con células HT-29

Construcción	Eliminación a las 24 h (pM)	Eliminación a las 48 h (pM)	CD4+ CD69+ (%)	CD4+ CD25+ (%)	CD8+ CD69+ (%)	CD8+ CD25+ (%)
TCB de FolR1 16D5	2,8	0,1	0,69	0,62	0,021	0,028

Ejemplo 16

Unión a eritrocitos y activación de células T en sangre completa

Para probar que no hay activación espontánea en ausencia de células tumorales que expresan FolR1 se ensayó si hay unión de los clones de FolR1 a eritrocitos, que potencialmente pueden expresar FolR1. No se pudo observar unión específica de la IgG 16D5 y de la IgG Mov19 a eritrocitos, se incluyó la IgG DP47 como control negativo (figura 8).

Para excluir cualquier unión no específica adicional a células sanguíneas o activación no específica a través de TCB de FolR1, se añadieron el TCB 16D5 y el TCB Mov19 en sangre completa y se analizó la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ mediante citometría de flujo. Se incluyó el TCB DP47 como control negativo. No pudo observarse activación de células T con ninguna de las construcciones ensayadas analizando la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ (figura 9).

Ejemplo 19

Expresión de FolR1 en células epiteliales primarias

FolR1 se expresa a bajo nivel en células epiteliales primarias. En el presente documento se intentó probar si estos niveles son suficientes para inducir eliminación mediada por células T en presencia de los TCB de FolR1. Para comprobar esto se usaron células epiteliales bronquiales humanas primarias, células epiteliales del plexo coroide humano primarias, células epiteliales corticales renales humanas primarias y células epiteliales pigmentarias retinales humanas primarias. Como control positivo se incluyeron células SKOV3 o HT-29 positivas a FolR1. En primer lugar se verificó la expresión de FolR1 en las células primarias usadas y se determinó la cantidad de sitios de unión a FolR1 en estas células. Las células epiteliales bronquiales, las células epiteliales corticales renales y las células epiteliales pigmentarias retinales expresan niveles muy bajos pero significativos de

FolR1 en comparación con los niveles expresados en células tumorales. Las células epiteliales del plexo coroide no expresan niveles significativos de FolR1.

Tabla 18: Sitios de unión a FolR1 en células epiteliales primarias

Línea celular	**Sitios de unión**
Epitelio bronquial	492
Epitelio del plexo coroide	104
Epitelio cortical renal	312
Epitelio pigmentario retinal	822
Skov3	69’890

Las células epiteliales primarias que mostraron expresión de FolR1 en su superficie se usaron para abordar la cuestión de si estas células pueden eliminarse por células T en presencia de los TCB de FolR1. No pudieron medirse niveles significativos de eliminación pero se detectó activación de células T en presencia de células epiteliales pigmentarias retinales, células epiteliales bronquiales y células corticales renales, dando como resultado la regulación positiva de CD25 y CD69. La activación más fuerte se observa con células epiteliales pigmentarias retinales, dando como resultado una regulación positiva de CD25 y CD69 tanto en células T $CD4^+$ como en células T $CD8^+$. En presencia de células epiteliales bronquiales se induce una menor activación de células T con la regulación positiva de CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ pero una regulación positiva muy baja de CD25 solo en células T $CD4^+$ pero no en células T $CD8^+$. Se obtiene la menor activación de células T en presencia de células epiteliales renales sin regulación positiva de CD25 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ y CD69 solo se regula positivamente en células T $CD8^+$ (figuras 12A-X).

Ejemplo 20

Comparación de diferentes formatos de TCB que contienen molécula de unión 16D5

Para determinar si el formato invertido 2+1 de TCB es el formato más activo con la molécula de unión a FolR1 seleccionada, se produjeron diferentes formatos que contenían 16D5 y se compararon respecto de la unión a célula diana, eliminación

mediada por células T y activación de células T. La molécula de unión 16D5 se ensayó en el formato invertido 2+1 de TCB (fig. 1A), clásico 2+1 de TCB (fig. 1D), clásico 1+1 de TCB (fig. 1C) y cabeza a cola 1+1 de TCB (fig. 1B).

Todas las construcciones se ensayaron respecto de la unión a FolR1 en células HeLa. Las moléculas bivalentes respecto de la unión a FolR1 se unen más fuerte en comparación con las construcciones monovalentes debido a la avidez. La diferencia entre las construcciones bivalentes frente a las monovalentes es más pronunciada para 16D5. El motivo puede ser que debido a la menor afinidad de 16D5 el efecto de avidez para esta molécula de unión es más fuerte. Entre los dos TCB 1+1 no hay diferencia significativa en la unión pero hay una diferencia entre las dos construcciones 2+1. La construcción invertida 2+1 se une con más fuerza a FolR1 que la construcción clásica 2+1. Esto indica que en la construcción 2+1 clásica la unión a FolR1 está influenciada por la presencia del Fab de CD3 mientras que en la construcción invertida la unión está menos influenciada.

Al ensayar la eliminación mediada por células T con estas construcciones se pudo demostrar que la unión más fuerte del TCB invertido 2+1 se convierte en una eliminación de células tumorales y una activación de células T más fuerte en comparación con el TCB clásico 2+1. El TCB clásico 2+1 de FolR1 16D5 es solo un poco más activo que la construcción de cabeza a cola 1+1 respectiva. La construcción de cabeza a cola 1+1 es significativamente más activa que la construcción clásica 1+1. Esto no refleja la situación observada en la unión y puede deberse a una mejor reticulación con la construcción de cabeza a cola. La eliminación de células tumorales y la activación de células T general es comparable con todas las construcciones ensayadas, las diferencias en cuanto a la potencia observada con las diferencias están únicamente en términos de valores de CE50. En general, puede concluirse que TCB invertido 2+1 de FolR1 independientemente de la molécula de unión usada es el formato preferido para inducir eliminación de células tumorales mediada por células T y activación de células T (véase la fig. 13A-C y la fig. 14A-C).

Tabla 19 Valores de CE50 de unión a células diana y de eliminación mediada por células T con diferentes formatos de TCB

Construcción	**CE50 de unión (nM)**	**Eliminación a las 24 h (pM)**	**Eliminación a las 48 h (pM)**
TCB invertido 2+1 de FolR1 16D5	11,03	1,43	0,18
TCB clásico 2+1	17,07	5,60	2,18

Construcción	CE50 de unión (nM)	Eliminación a las 24 h (pM)	Eliminación a las 48 h (pM)
de FolR1 16D5			
TCB clásico 1+1 de FolR1 16D5	107,3	n.d.	n.d.
TCB cabeza a cola 1+1 de FolR1 16D5	102,6	26,24	6,06

Tabla 20 Valores de CE50 de activación de células T en presencia de células SKOV3 con diferentes formatos de TCB

Construcción	CD4+CD25+ (%)	CD4+CD69+ (%)	CD8+CD25+ (%)	CD8+CD69+ (%)
TCB invertido 2+1 de FolR1 16D5	1,96	0,33	2,10	n.d.
TCB clásico 2+1 de FolR1 16D5	13,83	3,67	12,88	4,47
TCB clásico 1+1 de FolR1 16D5	38,54	n.d.	n.d.	n.d.
TCB cabeza a cola 1+1 de FolR1 16D5	17,14	7,47	25,15	n.d.

Ejemplo 21

Líneas de células tumorales y células primarias

Las células HeLa (CCL-2) se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en DMEM con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células SKOV3 (HTB-77) se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en RPMI con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células OVCAR5 se obtuvieron del NCI y se cultivaron en RPMI con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células HT-29 (ATCC-299) se obtuvieron del DSMZ y se

cultivaron en medio 5A de McCoy con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células MKN-45 (ACC-409) se obtuvieron del DSMZ y se cultivaron en RPMI con FCS al 10 % y glutamina 2 mM.

Todas las células epiteliales primarias se obtuvieron de ScienCell Research Laboratories. Las células de epitelio bronquial humano (HBEpiC, número de catálogo 3210 se cultivaron en medio de células epiteliales bronquiales (BEpiCM, n.º de cat. 3211, ScienCell). Las células epiteliales colónicas humanas (HCoEpiC), número de catálogo 2950 se cultivaron en medio de células epiteliales colónicas (CoEpiCM, n.º de cat. 2951, ScienCell). Las células epiteliales pigmentarias retinales humanas (HRPEpiC), número de catálogo 6540 se cultivaron en medio de células epiteliales (EpiCM, n.º de cat. 4101, ScienCell). Las células epiteliales corticales renales humanas (HRCEpiC), número de catálogo 4110, se cultivaron en medio de células epiteliales (EpiCM, n.º de cat. 4101, ScienCell). Las células epiteliales del plexo coroide humanas (HCPEpiC), número de catálogo 1310 se cultivaron en medio de células epiteliales (EpiCM, n.º de cat. 4101, ScienCell).

Ejemplo 22

Unión a diana mediante citometría de flujo

Las células diana indicadas se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de FACS. La tinción con anticuerpo se efectuó en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Posteriormente se sembraron 200.000 células por pocillo. La placa se centrifugó durante 4 min a 400 g y se retiró el sobrenadante. Los anticuerpos de ensayo se diluyeron en tampón de FACS y se añadieron 20 µl de la solución de anticuerpo a las células durante 30 min a 4 °C. Para eliminar el anticuerpo no unido las células se lavaron dos veces con tampón de FACS antes de la adición del anticuerpo secundario diluido (fragmento $F(ab')_2$ de cabra anti-IgG humana AffiniPure conjugado a FITC, fragmento Fcg, Jackson ImmunoResearch n.º 109-096-098 o fragmento $F(ab')_2$ de cabra anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE específico de fragmento Fcg, Jackson ImmunoResearch n.º 109-116-170. Después de 30 min de incubación a 4 °C el anticuerpo secundario no unido se eliminó mediante lavado. Antes de medir las células se resuspendieron en 200 µl de tampón de FACS y se analizaron mediante citometría de flujo usando un dispositivo BD Canto II o BD Fortessa.

Ejemplo 23

Internalización

Se recogieron las células y se determinó la viabilidad. Las células se resuspendieron en medio frío reciente a 2 millones de células por ml y la suspensión de células se transfirió a un tubo falcon de 15 ml para cada anticuerpo. Los anticuerpos que se

iban a ensayar para internalización se añadieron con una concentración final de 20 µg por ml a las células. Los tubos se incubaron durante 45 min en la sala fría sobre un agitador. Después de la incubación las células se lavaron tres veces con PBS frío para eliminar los anticuerpos no unidos. Se transfirieron 0,2 millones de células a la placa de FACS en el instante cero. Las células marcadas se resuspendieron en medio templado y se incubaron a 37 °C. En los instantes indicados se transfirieron 0,2 millones de células por pocillo en PBS frío, se lavaron emplacadas en la placa de FACS. Para detectar las construcciones que permanecían sobre la superficie se tiñeron las células con anticuerpo secundario anti-Fc humano marcado con PE. Posteriormente se añadieron 20 µl del anticuerpo diluido por pocillo y se incubó la placa durante 30 min a 4 °C. Después se lavaron dos veces las células para eliminar los anticuerpos no unidos y después se fijaron con FPA al 1 % para evitar cualquier internalización adicional. La fluorescencia se midió usando un dispositivo BD FACS CantoII.

Ejemplo 24

Análisis QIFIKIT®

QIFIKIT® contiene una serie de perlas, de 10 µm de diámetro y recubiertas con diferentes cantidades bien definida de moléculas de Mab de ratón (anti-CD5 humano de alta afinidad, Clon CRIS-1, isotipo IgG2a). Las perlas imitan a células con diferentes densidades de antígeno que se han marcado con un Mab primario de ratón, isotipo IgG. En resumen, las células se marcaron con anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido contra el antígeno de interés. En un pocillo de ensayo separado, las células se marcaron con anticuerpo monoclonal de ratón irrelevante (control de isotipo). Entonces, las células, las perlas de preparación y las perlas de calibración se marcaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fluoresceína incluido en el kit. El anticuerpo primario usado para marcar las células tiene que usarse a una concentración saturante. El anticuerpo primario puede ser de cualquier isotipo de IgG de ratón. En estas condiciones, el número de moléculas de anticuerpo primario unidas corresponde al número de sitios antigénicos sobre la superficie celular. El anticuerpo secundario se usa también a concentración saturante. Por consiguiente, la fluorescencia está relacionada con el número de moléculas de anticuerpo primario unida sobre las células y sobre las perlas.

Ejemplo 25

Eliminación de células tumorales mediada por células T y activación de células T

Las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se contaron y se comprobó la viabilidad. Las células se resuspendieron en sus medios respectivos con una concentración final de 300.000 células por ml. Después se transfirieron 100 µl de

la suspensión de células diana en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano. La placa se incubó durante toda la noche a 37 °C en el incubador para permitir la adherencia de las células a la placa. Al día siguiente se aislaron PBMC de sangre completa de donantes sanos. La sangre se diluyó a 2:1 con PBS y se dispuso sobre 15 ml de Histopaque-1077 (n.º 10771, Sigma-Aldrich) en tubos Leucosep y se centrifugó durante 30 min a 450 g sin freno. Después de la centrifugación se recogió la banda que contenía las células con una pipeta de 10 ml y se transfirió a tubos de 50 ml. Los tubos se enrasaron con PBS a 50 ml y se centrifugaron (400 g, 10 min, temperatura ambiente). El sobrenadante se retiró y se resuspendió el sedimento en PBS. Después de la centrifugación (300 g, 10 min, temperatura ambiente), se descartaron los sobrenadantes, se agruparon 2 tubos y se repitió la etapa de lavado (esta vez centrifugación a 350 g, 10 min, temperatura ambiente). Posteriormente se resuspendieron las células y se agruparon los sedimentos en 50 ml de PBS para el recuento de células. Después del recuento se centrifugaron las células (350 g, 10 min, temperatura ambiente) y se resuspendieron a 6 millones de células por ml en RPMI con FCS al 2 % y glutamina 2 nM. Se retiró el medio de las células diana emplacadas y se añadieron también los anticuerpos diluidos en RPMI con FCS al 2 % y glutamina 2 nM. Se transfirieron 300.000 células de la solución de células efectoras a cada pocillo dando como resultado una relación E:T de 10:1. Para determinar la liberación máxima se lisaron las células con Triton X-100. La liberación de LDH se determinó tras 24 h y 48 h usando el kit de detección de citotoxicidad (n.º 1644793, Roche Applied Science). La regulación positiva de marcadores de activación en células T después de la eliminación de células tumorales se midió mediante citometría de flujo. En resumen, se recogieron PBMC, se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se tiñeron con anticuerpos CD4 PE-Cy7 (n.º 3557852, BD Bioscience), CD8 FITC (n.º 555634, BD Bioscience), CD25 APC (n.º 555434, BD Bioscience), CD69 PE (n.º 310906, BioLegend) diluidos en tampón de FACS. Después de 30 min de incubación a 4 °C se lavaron las células dos veces con tampón de FACS. Antes de medir la fluorescencia usando el dispositivo BD Canto II se resuspendieron las células en 200 µl de tampón de FACS.

Ejemplo 26

Activación de células T en sangre completa

Se añadieron 280 µl de sangre fresca a una placa cónica profunda de 96 pocillos. Después se añadieron 20 µl de los TCB diluidos a la sangre y se mezcló bien agitando la placa. Después de 24 h de incubación a 37 °C en un incubador se mezcló la sangre y se transfirieron 35 µl a una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Después se añadieron 20 µl de la mezcla de tinción de anticuerpo que

consistía en CD4 PE-Cy7 (n.º 3557852, BD Bioscience), CD8 FITC (n.º 555634, BD Bioscience), CD25 APC (n.º 555434, BD Bioscience), CD69 PE (n.º 310906, BioLegend) y CD45 V500 (n.º 560777, BD Horizon) y se incubaron durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Antes de medir se añadieron 200 µl de la solución de lisis BD FACS recién preparada (n.º 349202, BD FACS) a la sangre. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente las células se midieron con un dispositivo BD Fortessa.

Ejemplo 27

Estudio FCDU (farmacocinético de dosis única) de TCB de FOLR1 humanizado (clon 16D5) en ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) inmunodeficientes

Se mantuvo a ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) hembra, de 6-7 semanas de edad al comienzo del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) en condiciones libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (P2011/128). Tras la llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

Se inyectó a los ratones por vía i.v. 10/1/0,1 µg/ratón de TCB de FolR1 y se extrajo sangre de 3 ratones por grupo e instante. Se inyectó a todos los ratones un volumen total de 200 µl de la solución adecuada. Para obtener la cantidad adecuada del TCB de FolR1 por cada 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. Se recogieron muestras de suero a los 5 min, 1h, 3h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h y 168h después de la inyección de la terapia.

La figura 15 muestra que el TCB de FolR1 16D5 muestra propiedades FC similares a IgG típicas y proporcionales a la dosis en ratones NOG con una baja eliminación.

Tabla 21: Condiciones experimentales.

Compuesto	**Dosificación**	**Tampón de formulación**	**Concentración (mg/ml)**
TCB de FolR1 (16D5)	10 µg (correspondientes a aprox. 0,5 mg/kg)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,43 (= solución madre)

Compuesto	Dosificación	Tampón de formulación	Concentración (mg/ml)
TCB de FolR1 (16D5)	1 µg (correspondientes a aprox. 0,05 mg/kg)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,43 (= solución madre)
TCB de FolR1 (16D5)	0,1 µg (correspondientes a aprox. 0,005 mg/kg)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,43 (= solución madre)

Ejemplo 28

Eficacia *in vivo* de TCB de FolR1 (clon 16D5) después de la transferencia de PBMC humanos en ratones NOG portadores de Skov3

El TCB de FolR1 se ensayó en la línea celular de carcinoma de ovarios Skov3, inyectada por vía s.c. en ratones NOG a los que se les ha injertado PBMC.

Las células de carcinoma de ovario Skov3 se obtuvieron de la ATCC (HTB-77). La línea celular de tumor se cultivó en RPMI que contenía FCS al 10 % (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO_2 al 5 %. El pase 35 se usó para trasplante, a una viabilidad > 95 %. Se inyectaron 5 x 10^6 células por animal por vía s.c. en el flanco derecho de los animales en un total de 100 µl de medio de cultivo celular RPMI (Gibco).

Se mantuvo a ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) hembra, de 6-7 semanas de edad al comienzo del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) en condiciones libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (P2011/128). Tras la llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

De acuerdo con el protocolo (figura 16), se inyectó a los ratones por vía s.c. en el día 0 del estudio con 5 x 10^6 células Skov3. En el día 21 del estudio, se aislaron PBMC humanos de un donante sano mediante el método de Ficoll y se inyectaron 10 x 10^6 células por vía i.p. en los ratones portadores de tumores. Dos días después, se aleatorizó a los ratones y se distribuyeron homogéneamente en cinco grupos de tratamiento (n = 12) seguido de inyección por vía i.v. con 10/1/0,1 µg/ratón del TCB de FolR1 o 10 µg/ratón del TCB de control DP47 una vez a la semana durante tres semanas. Se inyectaron a todos los ratones 200 µl de la solución adecuada. Se inyectó a los ratones en el grupo de vehículo con PBS. Para obtener la cantidad

adecuada de TCB por cada 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. El crecimiento tumoral se midió una vez a la semana usando un calibre (figura 17) y se calculó el volumen tumoral del modo siguiente:

V_T: (A^2/2) x L *(A: Anchura L: Longitud)*

La inyección semanal del TCB de FolR1 dio como resultado un efecto antitumoral dependiente de la dosis. Una dosis de 10 µg/ratón y de 1 µg/ratón indujo reducción del tumor y de 0,1 µg/ratón estasis tumoral (figura 17, tabla 22). La reducción tumoral máxima se logró a una dosis de 10 µg/ratón en comparación con el TCB DP47 de control no dirigido.

Tabla 22: Eficacia *in vivo*.

Compuesto	**Dosificación**	**Inhibición del crecimiento tumoral**
TCB de control TCB DP47	10 µg (correspondientes a aprox. 0,5 mg/kg)	7 %
TCB de FolR1 (16D5)	10 µg (correspondientes a aprox. 0,5 mg/kg)	90 %
TCB de FolR1 (16D5)	1 µg (correspondientes a aprox. 0,05 mg/kg)	74 %
TCB de FolR1 (16D5)	0,1 µg (correspondientes a aprox. 0,005 mg/kg)	56 %

Para las lecturas FD, se sacrificó a tres ratones por grupo de tratamiento en el día 32 del estudio, se extirparon los tumores y se prepararon suspensiones de células individuales mediante una digestión enzimática con colagenasa V, dispasa II y DNasa para su posterior análisis FACS (figura 19 y 20). Las células individuales se usaron bien directamente para la tinción de antígenos extracelulares y de marcadores de activación o se volvieron a estimular usando PMA a 5 ng/ml e ionomicina a 500 ng/ml en presencia del inhibidor del transporte de proteínas Monensina durante 5 h en medio de cultivo normal. Después de volver a estimular, se tiñeron las células para antígenos de superficie, seguido de una etapa de fijación y permeabilización. Las muestras fijadas se tiñeron entonces intracelularmente para TNF-□□IFN-□□IL-10 e IL-2 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se usó el

mismo procedimiento para la desgranulación de las células, pero se añadió un anticuerpo anti-CD107a durante el periodo de reestimulación y las muestras fijadas se tiñeron para el contenido intracelular de perforina y granzima B. El análisis FACS reveló números estadísticamente más altos de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en el tejido tumoral tras el tratamiento con TCB de FolR1 en comparación con el control de vehículo y TCB de control no dirigido. Además, se detectaron números mayores de células T productoras de TNF-, IFN- e IL-2 así como perforina$^+$/granzima-B$^+$ $CD4^+$ y $CD8^+$ en los tumores tratados con TCB de FOLR1. Las células T que se infiltraban en tumores tratadas con TCB de FolR1 también mostraron mayores tasas de desgranulación en comparación con los grupos de control.

En el día 38 de terminación del estudio, se sacrificó a todos los animales; se extirparon los tumores y se pesaron (figura 18). El peso de los tumores tratados con 10 y 1 µg/ratón del TCB de FOLR1 mostraron una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos de control.

Tabla 23: Condiciones experimentales.

Compuesto	**Dosificación**	**Tampón de formulación**	**Concentración (mg/ml)**
PBS			
TCB de FolR1 (16D5)	10 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,88 (= solución madre)
TCB de FolR1 (16D5)	1 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,88 (= solución madre)
TCB de FolR1 (16D5)	0,1 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,88 (= solución madre)
TCB DP47	10 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,35 (= solución madre)

Ejemplo 29

Generación de un anticuerpo biespecífico kappa-lambda de FolR1/CD3

Para generar un anticuerpo biespecífico (monovalente para cada antígeno) que pueda unirse simultáneamente a CD3 humano y al receptor alfa de folato humano

(FolR1) sin usar ninguna estrategia de heterodimerización (por ejemplo, la tecnología de pomo en agujero), se aplicó una combinación de una biblioteca de cadena ligera común con la tecnología denominada CrossMab; La región variable de las moléculas de unión a CD3 humanizadas (CH2527_VL7_46/13) se fusionó al dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano convencional para formar la molécula cruzada VLVH (fusionada a Fc) que es común para ambas especificidades. Para generar los homólogos cruzados (VHCL), se fusionó un dominio variable de cadena pesada específico de CD3 (CH2527_VH_23/12) a una cadena ligera humana constante mientras que un dominio variable de cadena pesada específico para FolR1 (clon 16D5, aislado de una biblioteca de cadena ligera común) se fusionó a una cadena ligera humana constante. Esto permite la purificación del anticuerpo biespecífico deseado aplicando etapas posteriores de purificación con columnas KappaSelect y LambdaFabSelect (GE Healthcare) para eliminar los anticuerpos homodiméricos no deseados.

Todos los vectores de expresión de anticuerpo se generaron usando tecnología de ADN recombinante convencional tal como se describe en Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los genes o los fragmentos génicos se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o se generaron a partir de oligonucleótidos sintéticos en Geneart AG (Regensburg, Alemania) mediante síntesis génica automatizada. Los fragmentos de ADN amplificados mediante la PCR o subclonados se confirmaron mediante secuenciación de ADN (Synergene GmbH, Suiza). El ADN de plásmido se transformó y amplificó en células hospedadoras de *E. coli* adecuadas para la preparación de ADN de plásmido de grado de transfección usando kits Maxiprep convencionales (Qiagen). Para la producción de las moléculas biespecíficas se transfectó a células HEK293 EBNA con plásmidos que codificaban los genes respectivos usando un método basado en polietilenimina (PEI) convencional. La relación de plásmido usada de los tres vectores de expresión fue 1:1:1. Las células transfectadas se cultivaron durante 7 días antes de recoger los sobrenadantes para su purificación. Los anticuerpos biespecíficos kappa-lambda de FolR1/CD3 se produjeron y purificaron del modo que sigue.

1. Transfección y producción transitoria

El anticuerpo biespecífico kappa-lambda se produjo de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se sembraron 400 millones de células

HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadieron ácido valproico 1 mM y alimentación 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recogió el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

2. Purificación

El anticuerpo biespecífico kappa-lambda se purificó en tres etapas usando una etapa de afinidad específica para las cadenas ligeras kappa, seguida de una etapa de afinidad específica para las cadenas ligeras lambda y finalmente mediante una etapa de cromatografía de exclusión por tamaños para retirar los agregados. El sobrenadante obtenido a partir de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando Tris 2 M, pH 8,0) y se aplicó a una matriz de afinidad de kappa Capture Select, o HiTrap KappaSelect, GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 1 ml, equilibrada con 5 volúmenes de columna (cv) de tampón A (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0). Después de lavar con 15 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,0) en 25 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó el pH de la solución a pH 8,0 (usando Tris 2 M, pH 8,0). Las fracciones neutralizadas agrupadas se aplicaron a una matriz de afinidad de lambda Capture Select (en este caso: HiTrap LambdaFabSelect, GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 1 ml) equilibrada con 5 volúmenes de columna (vc) de tampón A (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0). Después de lavar con 15 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,0) en 25 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó el pH de la solución a pH 8,0 (usando Tris 2 M, pH 8,0). Esta solución se concentró usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius) y posteriormente se aplicaron a una columna Superdex^{TM} 200 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0,

NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. Las fracciones agrupadas después de la exclusión por tamaño se concentraron de nuevo usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius).

La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Solo se pudieron purificar pequeñas cantidades de proteína con un rendimiento final de 0,17 mg/l.

Ejemplo 30

Eliminación mediada por células T con anticuerpo biespecífico kappa-lambda de FolR1/CD3

La actividad del TCB de FolR1 kappa lambda se ensayó en células SKOV3 en presencia de PBMC recién aislados. Como control negativo se incluyó TCB DP47. La eliminación de células SKOV3 mediada por células T se determinó tras 24 h y 48 h mediante liberación de LDH. Después de 48 h las células T se recogieron y se midió la regulación positiva de CD69 y CD25 en células T CD4 y células T CD8 mediante citometría de flujo.

La construcción de FolR1 kappa lambda induce la eliminación de células SKOV3 de una manera dependiente de la concentración que se acompaña de regulación positiva de CD69 y CD25 tanto en células T CD4 como en células T CD8.

Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Tras 24 h y 48 h se determinó la eliminación de células tumorales midiendo la liberación de LDH (Fig. 21). Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Después de 48 h se midió la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD4 y células T CD8 mediante citometría de flujo (Fig. 22).

Ejemplo 31

Caracterización bioquímica de moléculas de unión a FolR1 16D5 y 36F2 mediante resonancia de plasmón superficial

La unión de 16D5 anti-FolR1 en diferentes formatos biespecíficos de célula T monovalentes o bivalentes y de 36F2 anti-FolR1 como IgG o como biespecífico de célula T al receptor 1 de folato recombinante humano, de cinomolgo y murino (todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15

M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, GE Healthcare).

1. Moléculas ensayadas

Las moléculas usadas para la determinación de la afinidad y la avidez se describen en la tabla 24.

Tabla 24: Nombre y descripción de las 6 construcciones usadas en el análisis mediante SPR

Nombre	**Descripción**
TCB 16D5	formato invertido, biespecífico de célula T 2+1 (cadena ligera común)
TCB 16D5 clásico,	formato clásico, biespecífico de célula T 2+1 (cadena ligera común)
TCB 16D5 1+1	biespecífico de célula T 1+1 (cadena ligera común)
TCB 16D5 1+1 HT	cabeza a cola biespecífico de célula T 1+1 (cadena ligera común)
IgG 36F2	IgG1 humana con P329G LALA
TCB 36F2	crossfab, formato invertido, biespecífico de célula T 2+1

2. Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 25).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una

microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, GE Healthcare). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 3,7 a 900 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 240 o 600 segundos. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 30 s de glicina-HCl 10 mM pH 2. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de CD134 murino-Fc biotinilada recombinante. Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las IgG o de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). Para las moléculas biespecíficas de célula T de formato 1+1 la interacción es realmente 1:1 y la KD representa la afinidad ya que hay solo una molécula de unión a FolR1 en esta construcción.

Tabla 25: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de 16D5 y 36F2 como IgG anti-FolR1 o como moléculas biespecíficas (TCB) en FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
IgG 36F2	**huFolR1**	2,07E+06	1,3E-02	6 nM
	cyFolR1	2,78E+06	1,75E-02	6 nM
	muFolR1	4,28E+05	8,23E-04	2 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	2,45E+06	9,120E-03	4 nM
	cyFolR1	4,31E+06	1,45E-02	3 nM
	muFolR1	6,97E+05	9,51E-04	1 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	1,57E+05	3,92E-04	3 nM
	cyFolR1	2,01E+05	3,81E-04	2 nM
TCB 16D5 clásico,	**huFolR1**	2,04E+05	1,84E-04	0,9 nM
	cyFolR1	2,50E+05	3,05E-04	1 nM

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD aparente
TCB 16D5 1+1 HT	**huFolR1**	5,00E+04	2,25E-03	45 nM
	cyFolR1	5,75E+04	4,10E-03	70 nM
TCB 16D5 1+1	**huFolR1**	3,65E+04	2,04E-03	56 nM
	cyFolR1	4,09E+04	3,60E-03	90 nM

3. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 26).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 12000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,3 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano, de cinomolgo o murino a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 26: Unión monovalente (afinidad) de 16D5 y 36F2 como IgG anti-FolR1 o como moléculas biespecíficas (TCB) en FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
IgG 36F2	**huFolR1**	9,10E+04	6,65E-02	730 nM
	cyFolR1	1,02E+05	5,78E-02	570 nM

	muFolR1	8,32E+04	1,78E-02	210 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	5,94E+04	6,13E-02	1000 nM
	cyFolR1	6,29E+04	5,42E-02	860 nM
	muFolR1	5,68E+04	1,75E-02	300 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	2,23E+04	7,33E-04	33 nM
	cyFolR1	1,57E+04	1,60E-03	100 nM
TCB 16D5 clásico,	**huFolR1**	1,03E+04	7,59E-04	74 nM
	cyFolR1	9,18E+03	1,61E-03	175 nM
TCB 16D5 1+1 HT	**huFolR1**	2,05E+04	7,08E-04	35 nM
	cyFolR1	1,67E+04	1,53E-03	92 nM
TCB 16D5 1+1	**huFolR1**	1,43E+04	9,91E-04	69 nM
	cyFolR1	1,20E+04	1,80E-03	150 nM

La afinidad (unión monovalente) a FolR1-Fc de ser humano y de cinomolgo de TCB 36F2 es similar y de aproximadamente 1000 nM para ambos, mientras que la afinidad a FolR1-Fc murino es ligeramente mejor y de aproximadamente 300 nM. 36F2 puede usarse en modelos murinos y de primate, no hay necesidad de un subrogado.

La avidez (KD aparente) de TCB 36F2 a FolR1 humano es aproximadamente 30 veces menor que la afinidad del TCB 16D5 a FolR1 humano. En el formato bivalente, TCB 36F2 se encuentra en el bajo intervalo nanomolar, mientras que TCB 16D5 se encuentra en el bajo intervalo picomolar (diferencia de 1000 veces).

FolR1 se sobreexpresa en células tumorales, a niveles intermitentes y elevados, sobre la superficie de células cancerosas en un espectro de neoplasias epiteliales, incluyendo cánceres de ovario, mama, renal, colorrecal, pulmón y otros cánceres sólidos y también se expresa en la superficie apical de un subconjunto limitado de células epiteliales polarizadas en tejidos normales. Estas células normales no tumorales expresan FolR1 solo a bajos niveles, e incluyen, por ejemplo, células epiteliales bronquiales en la superficie alveolar, el límite luminal cortical renal de células tubulares, el epitelio pigmentario retinal (membrana basolateral) y el plexo coroide.

TCB 16D5 se une a células de tejidos normales que expresan bajas cantidades de FolR1, lo que da como resultado su eliminación mediada por células T. Esto podría, al menos en parte, ser el motivo de la tolerancia limitada observada a 10 µg/kg en monos cinomolgos. Los presentes inventores quisieron determinar si disminuyendo la afinidad de la molécula biespecífica de células T se podría aumentar la diferenciación entre tejidos con alta y baja densidad de diana y, de este modo, disminuir la toxicidad haciendo uso de la unión bivalente y la avidez. Las moléculas

de unión de baja afinidad normalmente no se seleccionan como candidatos adecuados para su análisis posterior debido a que la baja afinidad se asocia a menudo con una baja potencia y eficacia. Sin embargo, se desarrolló en varios formatos la molécula de unión a FolR1 36F2 de baja afinidad y se caracterizó respecto de sus propiedades biológicas. Para el 36F2 usado en el formato biespecífico de célula T bivalente el efecto de avidez (diferencia entre unión monovalente y bivalente) es de aproximadamente 250 veces (1000 nM frente a 4 nM). A baja densidad de la diana, la afinidad definió la interacción y con 1000 nM dio lugar a una baja potencia del TCB. Sin embargo, a alta densidad de diana la avidez de la molécula entra en juego y con 4 nM dio lugar a una alta actividad del TCB (véase el ejemplo 32).

En una estrategia alternativa, los presentes inventores generaron formatos monovalentes de 16D5 y variantes de baja afinidad de 16D5 (afinidad de aproximadamente 10-40 nM) en un formato bivalente. La molécula de unión 16D5 usada en un formato monovalente (1+1) tiene una afinidad de aproximadamente 50 nM. La diferenciación entre tejidos de alta y baja densidad de diana puede lograrse mejor beneficiándose del efecto de avidez.

Ejemplo 32

Eliminación mediada por células T de células SKOV-3 inducida por TBC 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5

Se evaluó la eliminación por células T mediada por anticuerpos TCB 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5 se evaluó en células SKov-3 (FolR1 medio). Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h y 48 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1

% (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,005 pM - 5 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h y 48 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que la eliminación inducida por 36F2 está fuertemente reducida en comparación con TCB Mov19 y TCB 21A5 (figuras 23A-B). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación, calculados usando GraphPadPrism6 se resumen en la tabla 27.

Tabla 27: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células SKov-3 que expresan FolR1 inducida por TCB 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5.

	CE50 [pM]	
Anticuerpo	**24 h**	**48 h**
TCB 36F2	1406,07*	134,5
TCB Mov19	0,75	0,05
TCB 21A5	2,83	0,10

** la curva no alcanzó la saturación, el valor es hipotético*

Ejemplo 33

Eliminación por células T inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5 en diferentes formatos biespecíficos de célula T monovalentes y bivalentes

Se evaluó la eliminación por células T mediada por anticuerpos TCB 36F2, TCB 16D5, TCB 16D5 clásico, TCB 16D5 1+1 y TCB 16D5 HT de células tumorales Hela (FolR1 alto, aproximadamente 2 millones de copias, Tabla 14, Fig. 27), Skov-3 (FolR1 medio, aproximadamente 70000-90000 copias, Tabla 14, Fig. 27) y HT-29 (FolR1 bajo, aproximadamente 10000, Tabla 14, Fig. 27) humanas. Se incluyó el anticuerpo TCB DP47 como control negativo. Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h de incubación con el anticuerpo biespecífico. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se

lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 100 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que la eliminación específica de diana de las tres líneas celulares diana FolR1+ por TCB 36F2 es mucho más débil en comparación con la eliminación inducida por TCB 16D5 (Las **figuras** 24A-C, tabla 29). La eliminación específica de diana inducida por los TCB 16D5 monovalentes (HT 16D5 y 16D5 1+1) es peor en comparación con los TCB 16D5 bivalentes (TCB 16D5 y TCB 16D5 clásico). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación, calculados usando GraphPadPrism6, se resumen en la tabla 28. De manera importante, estos datos muestran que usando la molécula de unión a FolR1 36F2 en el formato de TCB bivalente 2+1 se amplía la ventana terapéutica en comparación con el TCB de FolR1 16D5 (Fig. 24A-C). Mientras que la reducción de la potencia entre el TCB de FolR1 16D5 y 36F2 es de aproximadamente 45 veces para células HeLa (expresión elevada de FolR1, véase la tabla 28: TCB 16D5 = 0,8 frente a TCB 36F2 36,0) y de aproximadamente 297 veces para células Skov3 (expresión media de FolR1, véase la tabla 28: TCB 16D5 = 0,6 frente a TCB 36F2 178,4), esta

reducción es de prácticamente 7000 veces para HT29 con baja expresión de FolR1 (véase la tabla 28: TCB 16D5 = 5,7 frente a TCB 36F2 39573). Por lo tanto, El TCB de FolR1 36F2 diferencia entre células de alta y baja expresión, lo que es de especial importancia para reducir la toxicidad, y que las células de algunos tejidos normales, no tumorales expresan niveles muy bajos de FolR1 (aproximadamente menos de 1000 copias por célula). De manera coherente con esta observación, los resultados discutidos en el ejemplo 35 más adelante demuestran que el TCB 36F2 no induce la eliminación por células T de células primarias (figuras 26A-D) mientras que puede observarse cierto grado de eliminación para TCB 16D5 en células HRCEpiC y HRPEpiC tras 48 h de incubación (figuras 26B y C). Esta característica importante de TCB 36F2 permite la dosificación para el tratamiento de tumores positivos a FolR1 de tal forma que media una potente eliminación de tejidos tumorales con expresión alta o media de FolR1, pero no de tejidos normales con baja expresión (parcialmente polarizada). De manera notable, esta característica parece estar mediada por la avidez de TCB 36F2 en el formato bivalente invertido 2+1, que no se observó cuando se usaron los formatos monovalentes 1+1 que portaban la misma molécula de unión de baja afinidad 36F2.

Dicho de otro modo, TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 comprende restos de unión a FolR1 de relativamente baja afinidad pero posee un efecto de avidez que permite diferenciar entre células con alta y baja expresión de FolR1. Debido a que las células tumorales expresan FolR1 a niveles elevados o intermedios, este TCB se une de manera selectiva a células tumorales y no a células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto.

Además de las características ventajosas anteriores, el TCB 36F2 en el formato invertido bivalente 2+1 tiene también la ventaja de que no necesita reticulación química u otra estrategia híbrida. Esto lo hace adecuado para la fabricación de un medicamento para tratar a pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen tumores cancerosos positivos a FolR1. El TCB 36F2 en el formato invertido bivalente 2+1 puede producirse usando procesos de CHO convencionales con bajos agregados. Además, el TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 comprende secuencias humanas y humanizadas, haciéndolo superior a las moléculas que emplean polipéptidos de rata y murinos que son altamente inmunogénicos cuando se administran a seres humanos. Además, el TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 se diseñó por ingeniería genética para suprimir la unión a FcgR y, como tal, no causa reticulación con FcgR y reacciones a la infusión, potenciando además su seguridad cuando se administra a pacientes.

Tal como se ha demostrado por los resultados descritos anteriormente, su geometría de cabeza a cola hace que el TCB 36F2 en el formato invertido bivalente 2+1 sea una molécula altamente potente que induce la eliminación absoluta de la célula

diana. Su bivalencia magnifica la avidez y la potencia, pero también permite diferenciar entre células con alta y baja expresión. Su preferencia por células de expresión alta o media de diana debido a su efecto de avidez reduce la toxicidad resultante de la eliminación mediada por células T de células normales que expresan FolR1 a niveles bajos.

Una ventaja adicional del TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 y otras realizaciones divulgadas en el presente documento es que su desarrollo clínico no necesita del uso de moléculas subrogadas ya que se unen a FolR1 humano, de cinomolgo y murino. Como tales, las moléculas divulgadas en el presente documento reconocen un epítopo distinto al de los anticuerpos para FolR1 descritos anteriormente que no reconocían a FolR1 de todas las especies.

Tabla 28: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células tumorales que expresan FolR1 inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5 en diferentes formatos monovalentes y bivalentes biespecíficos de células T tras 24 h de incubación.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,8	0,6	5,7
TCB 16D5 clásico,	4,6	2,0	13,0
TCB 16D5 HT	11,6	12,3	15,1
TCB 16D5 1+1	23,8	48,9	883,8*
TCB 36F2	36,0	178,4	*39573,0**

** la curva no alcanzó la saturación, solo valor hipotético*

La tabla 29 muestra una comparación de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2 en las diferentes líneas celulares ensayadas. De los valores de CE50 obtenidos se calculó el incremento (CE50 de TCB 16D5 menos CE50 de TCB 36F2) y la diferencia en x veces (CE50 de TCB 16D5 dividida entre la CE50 de TCB 36F2).

Tabla 29: Comparación de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,82	0,63	5,73
TCB 36F2	35,99	178,40	39573,00*

Δ	35,17	177,77	39567,27
x veces	43,83	284,61	6906,58

** la curva no alcanzó la saturación, solo valor hipotético*

Los valores de CE50 calculados muestran claramente que la diferencia entre TCB 36F2 y TCB 16D5 se hace mayor cuanto menor sea la expresión de FolR1 en las células diana.

Los mismos cálculos efectuados para la comparación de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2 se efectuaron para TCB 16D5 y los dos TCB 16D5 monovalentes (TCB 16D5 HT y 16D5 1+1). Las tablas 30 y 31 muestran las comparaciones de los valores de CE50 de TCB 16D5 frente a TCB 16D5 HT (tabla 30) y TCB 16D5 frente a TCB 16D5 1+1 (tabla 31) así como los incrementos correspondientes (CE50 de TCB 16D5 menos CE50 de TCB 16D5 HT/1+1) y las diferencias de x veces (CE50 de TCB 16D5 dividida entre la CE50 de TCB 16D5 HT/1+1).

Tabla 30: Comparación de valores de CE50 de TCB 16D5 (2+1 invertido) y TCB 16D5 HT.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,82	0,63	5,73
TCB 16D5 HT	11,61	12,27	15,11
Δ	10,79	11,65	9,38
x veces	14,14	19,58	2,64

Tabla 31: Comparación de valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 16D5 1+1.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,82	0,63	5,73
TCB 16D5 1+1	23,84	48,86	883,78*
Δ	23,02	48,24	878,05
x veces	29,03	77,95	154,24

** la curva no alcanzó la saturación, solo valor hipotético*

Las comparaciones de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2 (tabla 29) muestra que la diferencia en los valores de CE50 se hace mayor cuanto menor sea la expresión de FolR1 en las células diana. Este efecto no puede observarse en la comparación de TCB 16D5 y los TCB 16D5 monovalentes (tabla 29 y tabla 30). Para

TCB 16D5 1+1 (tabla 31) también hay un ligero aumento en la diferencia entre la CE50 de TCB 16D5 y TCB 16D5 1+1 con la disminución de la expresión de FolR1 pero ni de lejos tan pronunciada como la que puede observarse en la comparación de TCB 16D5 frente a TCB 36F2.

Ejemplo 34

Regulación positiva de CD25 y CD69 en células efectoras CD8+ y CD4+ tras la eliminación por células T de células tumorales que expresan FolR1 inducida por TCB 36F2 y el anticuerpo TCB 16D5

La activación de células T $CD8^+$ y $CD4^+$ después de la eliminación por células T de células tumorales Hela, SKov-3 y HT-29 que expresaban FolR1 mediada por TCB 36F2 y TCB 16D5 se evaluó mediante análisis FACS usando anticuerpos que reconocían los marcadores de activación de células T CD25 (marcador de activación tardío) y CD69 (marcador de activación temprana). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión. El anticuerpo y las condiciones del ensayo de eliminación fueron esencialmente como se describieron anteriormente (ejemplo 32) usando el mismo intervalo de concentración del anticuerpo (0,01 pM – 100 nM en triplicados), relación E:T 10:1 y un tiempo de incubación de 48h.

Después de la incubación, se transfirieron los PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugaron a 400 x g durante 4 min y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1 %. La tinción superficial para CD8 (PE anti-CD8 humano, BD n.º 555635), CD4 (Brilliant Violet 421™ anti-CD4 humano, Biolegend n.º 300532), CD69 (FITC anti-CD69 humano, BD n.º 555530) y CD25 (APC anti-CD25 humano, BD n.º 555434) se efectuó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 %. Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS al 0,1 % para la medida de FACS. Las muestras se analizaron en un dispositivo BD FACS Canto II.

TCB 36F2 indujo una regulación positiva específica de la diana de los marcadores de activación (CD25, CD69) en células T CD8+ y CD4+ tras la eliminación de células Hela (figura 25A) y SKov-3 (figura 25B). En comparación con TCB 16D5 la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD8+ y CD4+ inducida por 36F2 es mucho más débil.

En HT-29 (FolR1 bajo) solo puede observarse una regulación positiva de los marcadores de activación a la concentración más alta de TCB 36F2. Por el contrario, con TCB 16D5 la regulación positiva de CD25 y CD69 ya puede observarse a concentraciones de anticuerpo mucho más bajas (figura 25C).

Tal como también se observa en el experimento de lisis tumoral, el análisis de los

marcadores de activación (CD25 y CD69) en células T (CD4+ y CD8+) después de la eliminación muestra claramente que la diferencia entre TCB 16D5 y TCB 36F2 se hace mayor cuanto menor es el nivel de expresión de FolR1 en la célula diana.

Ejemplo 35

Eliminación por células T de células primarias inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5

La eliminación por células T mediada por TCB 36F2 y TCB 16D5 se evaluó en células primarias (células epiteliales corticales renales humanas (HRCEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 4110) y células epiteliales pigmentarias retinales humanas (HRPEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 6540)). Se incluyeron células HT-29 (FolR1 bajo) como línea celular de control. TCB DP47 sirvió de control sin unión. Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h y 48 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 10 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h y 48 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que TCB 36F2 no induce eliminación por células T de células primarias (figura 26A - D) mientras que puede observarse cierto grado de eliminación para TCB 16D5 en células HRCEpiC y HRPEpiC tras 48 h de incubación (figura 26B y D). Tal como se ha descrito anteriormente, se observó una fuerte diferencia en la eliminación por células T de células HT-29 entre TCB 16D5 y TCB 36F2 (Fig. 26E, F).

Ejemplo 36

Preparación de TCB DP47 GS

(2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertido = “TCB no dirigido”)

El “TCB no dirigido” se usó como control en los experimentos anteriores. El anticuerpo biespecífico se acopla a CD3e pero no se une a cualquier otro antígeno y por lo tanto no puede reticular a células T con ninguna célula diana (y por consiguiente no puede inducir eliminación). Por lo tanto se usó como control negativo en los ensayos para controlar cualquier activación inespecífica de células T. Este TCB no dirigido se preparó tal como se describe en el documento WO2014/131712. En resumen, se subclonaron las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera en fase con la cadena pesada constante o la cadena ligera constante preinsertadas en el vector de expresión en mamífero receptor respectivo. La expresión del anticuerpo estaba dirigida por un promotor de MPSV y porta una secuencia de señal de poli A sintética en el extremo 3' del CDS. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de VEB.

La molécula se produjo transfectando conjuntamente a células HEK293-EBNA con los vectores de expresión en mamífero usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión a una relación 1:2:1:1 ("vector de Fc(agujero) de cadena pesada": "vector de cadena ligera": "vector de crossfab de cadena ligera": “vector vector de Fc(pomo) de cadena pesada-FabCrossfab”).

Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agitó vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a

un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadieron ácido valproico 1 mM y alimentación 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recogió el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

La proteína secretada se purificó a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. Se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap ProteinA HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína diana se eluyó usando un gradiente en 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5 a citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 2,5. La solución de proteína se neutralizó añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8. La proteína diana se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, solución de cloruro de sodio 140 mM pH 6,0.

La concentración proteica de las muestras de proteína purificada se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos.

La pureza y peso molecular de las moléculas se analizaron mediante análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Lifescience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µg de muestra para los análisis.

El contenido agregado de las muestras de anticuerpo se analizó usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C.

Tabla 32: Resumen de la producción y purificación de TCB DP47 GS

Construcción	Título [mg/l]	Rendimiento [mg/l]	Agregado después de la 1ª	APM [%]	BPM [%]	Monómero [%]

			etapa de purificación [%]			
TCB DP47 GS	103,7	8,04	8	2,3	6,9	91,8

Tabla 33: Análisis de CE-SDS de TCB DP47 GS

	Pico	kDa	Cadena correspondiente
TCB DP47 GS no reducido (A)	1	165,22	Molécula con 2 cadenas ligeras ausentes
	2	181,35	Molécula con 1 cadena ligeras ausente
	3	190,58	Molécula correcta con glucosilación unida en N
	4	198,98	Molécula correcta
TCB DP47 GS reducido (B)	1	27,86	Cadena ligera DP47 GS
	2	35,74	Cadena ligera huCH2527
	3	63,57	Fc(agujero)
	4	93,02	Fc(pomo)

Ejemplo 37

Unión de TCB 16D5 y sus correspondientes variantes de desamidación de CD3 N100A y S100aA a células Jurkat que expresan CD3

Se evaluó la unión de TCB 16D5 y de las variantes de desamidación de CD3 correspondientes TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA a CD3 en una línea de linfocitos T inmortalizada que expresa CD3 (Jurkat). En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (686 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG

humana de fragmento F(ab')$_2$ AffiniPure conjugado a PE (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-116-170). después de lavar las muestras dos veces con PBS frío con BSA al 0,1 % se analizaron inmediatamente mediante FACS usando un FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 28A-B).

Los resultados muestran unión reducida de las variantes de desamidación N100A y S100aA a CD3 en comparación con los anticuerpos progenitores TCB 16D5 (Fig. 28A)

Ejemplo 38

Eliminación por células T de células SKov-3 y HT-29 inducida por TCB 16D5 y sus variantes de desamidación de CD3 N100A y S100aA

Se evaluó la eliminación por células T mediada por TCB 16D5 y las correspondientes variantes de desamidación de CD3 TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA en células SKov-3 (FolR1 medio) y HT-29 (FolR1 bajo). Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 10 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante

incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que en células SKov-3 la eliminación inducida por las variantes de desamidación de CD3 TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA es comparable a la inducida por TCB 16D5 (Fig. 29A). En células HT-29 que expresan FolR1 bajo la variante S100aA muestra una eficacia de la eliminación deteriorada que es el caso para TCB 16D5 (Fig. 30A). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación, calculados usando GraphPadPrism6 se proporcionan en la tabla 35.

Tabla 35: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células SKov-3 y HT-29 que expresan FolR1 inducida por TCB 16D5 y sus variantes de desamidación N100A y A100aA.

	CE50 [pM]	
Anticuerpo	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 16D5	1,283	56,67
TCB 16D5 N100A	1,886	91,95
TCB 16D5 S100aA	1,939	165,6

** No determinado*

Ejemplo 39

Caracterización bioquímica mediante resonancia de plasmón superficial de TCB de dos variantes de molécula de unión a CD3 (N100A y S100A) para eliminar un sitio de desamidación

Se evaluó la unión de dos TCB 16D5 con variantes de unión a CD3 (N100A o S100aA) a CD3 humano recombinante (heterodímero de CD3epsilon-CD3delta como fusión de Fc) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

Afinidad a CD3ed-Fc

La afinidad de la interacción entre las moléculas biespecíficas de células T anti-

FolR1 y el heterodímero CD3 epsilon-delta recombinante se determinó tal como se describe a continuación (tabla 36).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 6000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 a 200 nM con un caudal de 20 µl/min durante 60 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (4,1 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano y de cinomolgo a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 240 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 36: Unión monovalente (afinidad) de dos variantes de desamidación de CD3 de 16D5 como TCB en CD3ed-Fc humano.

Ligando	**Analito**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD**
TCB 16D5 N100A	**huCD3**	1,23E+04	4,67E-03	380 nM
TCB 16D5 S100aA	**huCD3**	1,21E+04	5,49E-03	460 nM
TCB 16D5	**huCD3**	2,03E+04	4,41E-03	220 nM

Las dos variantes de desamidación de CD3 tienen una afinidad ligeramente reducida en comparación con la molécula de unión de CD3 de tipo silvestre (CH2527), pero la diferencia no es grande.

Ejemplo 40

Producción y purificación de dos variantes de 16D5 biespecífico de células T con mutaciones para eliminar el sitio de desamidación en la molécula de unión a CD3: TCB 16D5 N100A, TCB 16D5 S100aA

Transfección y producción transitoria

Las dos variantes de desamidación de los TCB 16D5 se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C. Después de la producción se recogió el sobrenadante, se filtró a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación

Las dos variantes de desamidación de TCB 16D5 se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna MabSelect SuRe (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 2 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, citrato de sodio 20 mM). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 20 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron hasta 1 ml usando

ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Se agruparon las fracciones que contenían menos del 2 % de oligómeros. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 36: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de las dos variantes de desamidación de 16D5 en el formato biespecífico de célula T.

Nombre	Mutación en la molécula de unión a CD3	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
TCB 16D5	N100A	9	100	89
TCB 16D5	S100aA	23	100	83
TCB 16D5	Tipo silvestre	9	100	93

Ambos TCB se produjeron con buena calidad, similar a la construcción con la molécula de unión a CD3 de tipo silvestre.

Ejemplo 41

Producción y purificación de dos variantes de moléculas de unión de 16D5 (D52dE y D52dQ) como IgG para eliminar un punto caliente en la CDR

Transfección y producción transitoria

Las dos IgG se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron

de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantiene a 4 °C. Después de la producción se recogen los sobrenadantes y los sobrenadantes que contienen anticuerpo se filtraron a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación de anticuerpos

Las dos IgG se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna POROS MabCapture A (Applied Biosystems, volumen de columna (vc) = 1 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 5 vc. Los 5 ml que contenían la proteína de interés se almacenaron en un bucle en el Äkta Explorer y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad 16/60 Superdex^{TM} 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM (no se usó Tween). Las fracciones que contenían las IgG se agruparon y concentraron usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore). El contenido agregado del grupo final se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un

agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se almacenaron a 4 °C.

Tabla 37: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de dos variantes de punto caliente de IgG de 16D5.

Clon	Mutación HC/LC	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
16D5	D52dE	24	100	96
16D5	D52dQ	20	100	96

Ambas IgG se produjeron bien y con buena calidad.

Ejemplo 42

Caracterización bioquímica mediante resonancia de plasmón superficial de dos variantes de moléculas de unión de 16D5 (D52dE y D52dQ) como IgG para eliminar un punto caliente en la CDR

Se evaluó la unión de dos variantes de molécula de unión de 16D5 (D52dE y D52dQ) como IgG para receptor 1 de folato recombinante humano y de cinomolgo (ambos como fusiones a Fc) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

1. Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 38).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 160 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 3,7 a 900 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 600 segundos. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2 murino-Fc biotinilada recombinante. Las curvas de unión resultantes de la unión

bivalente de las IgG o de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 38: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de dos variantes de punto caliente de 16D5 como IgG en FolR1 humano, murino y de cinomolgo (sin unión a muFolR1, tal como se esperaba).

Analito	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
IgG 16D5 D52dE	**huFolR1**	1,62E+05	5,45E-04	3,4 nM
	cyFolR1	2,98E+06	7,47E-03	2,5 nM
IgG 16D5 D52dQ	**huFolR1**	8,40E+04	7,75E-04	9,2 nM
	cyFolR1	4,12E+05	2,04E-03	5 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	2,25E+05	5,00E-04	2,2 nM
	cyFolR1	2,71E+05	6,3E-04	2,5 nM

2. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 39).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 10000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,35 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano y de cinomolgo a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto

restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 39: Unión monovalente (afinidad) de dos variantes de punto caliente de 16D5 como IgG en FolR1 humano y de cinomolgo.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
IgG 16D5 D52dE	**huFolR1**	2,40E+04	2,27E-03	95 nM
	cyFolR1	2,25E+04	1,20E-02	530 nM
IgG 16D5 D52dQ	**huFolR1**	6,97E+03	1,62E-03	230 nM
	cyFolR1	8,20E+03	3,32E-03	410 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	2,05E+04	7,05E-04	35 nM
	cyFolR1	1,72E+04	1,62E-03	90 nM

Las dos variantes de punto caliente de 16D5 tienen una avidez similar (unión bivalente) a la de la molécula de unión 16D5 de tipo silvestre. La avidez disminuye ligeramente para la variante D52dQ y esta diferencia es aún más visible en la afinidad (unión monovalente).

Ejemplo 43

Producción y purificación de doce variantes de la molécula de unión 16D5 como IgG con mutaciones en la cadena ligera y pesada para reducir la afinidad a FolR1

Transfección y producción transitoria

Las doce IgG se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita

vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantiene a 4 °C. Después de la producción se recogen los sobrenadantes y los sobrenadantes que contienen anticuerpo se filtraron a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación de anticuerpos

Todas las moléculas se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna POROS MabCapture A (Applied Biosystems, volumen de columna (vc) = 1 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 5 vc. Los 5 ml que contenían la proteína de interés se almacenaron en un bucle en el Äkta Explorer y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad 16/60 Superdex^{TM} 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. Las fracciones que contenían las IgG se agruparon y concentraron usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore). El contenido agregado del grupo final se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se almacenaron a 4 °C.

Tabla 40: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de doce variantes de IgG de 16D5.

Clon	Mutación HC/LC	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
16D5	W98Y/wt	32	100	100
16D5	W98Y/K53A	24	100	100
16D5	S35H/wt	21	100	100
16D5	S35H/K53A	18	100	100
16D5	S35H/S93A	18	100	100
16D5	W96Y/wt	40	100	100
16D5	W96Y/K53A	21	100	100
16D5	W96Y/S93A	25	98	100
16D5	R50S/K53A	10	98	100
16D5	R50S/S93A	7	100	100
16D5	G49S/K53A	42	100	100
16D5	G49S/S93A	45	100	100

Todas las doce IgG se produjeron bien y con buena calidad.

Ejemplo 44

Caracterización bioquímica de las variantes de combinación de cadena pesada y ligera de 16D5 como IgG mediante resonancia de plasmón superficial

La unión de las moléculas de unión variantes de combinación de cadena pesada y ligera de 16D5 de FolR1 como IgG para diferentes receptores de folato recombinantes (FolR1 de ser humano, murino y de cinomolgo; todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 41).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una

microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 11,1 a 900 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 240 o 600 segundos. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2 murino-Fc biotinilada recombinante. Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las IgG o de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). Para las cinéticas de afinidad con fases de asociación y disociación demasiado rápidas como para ajustarlas a un modelo de unión de Langmuir 1:1, se aplicó el modelo de análisis de estado estacionario usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). El análisis de estado estacionario proporciona la KD de la reacción de unión en el equilibrio.

Tabla 41: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de doce moléculas de unión variantes de 16D5 como IgG en FolR1 de ser humano, murino y de cinomolgo.

Analito Variante de HC/variante de LC	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
W98Y/K53A	**huFolR1**			Unión débil
	cyFolR1			Unión débil
S35H/K53A	**huFolR1**	2,10E+04	2,91E-02	1400 nM
	cyFolR1	3,47E+04	4,04E-02	1100 nM
W96Y/K53A	**huFolR1**			580 nM (estado estacionario)
	cyFolR1			660 nM (estado estacionario)
W98Y/wt	**huFolR1**	1,36E+05	3,28E-02	240 nM

Analito Variante de HC/variante de LC	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD aparente
	cyFolR1	1,71E+05	3,61E-02	200 nM
S35H/S93A	**huFolR1**	2,43E+05	2,20E-02	90 nM
	cyFolR1	6,12E+05	6,77E-02	110 nM
G49S/K53A	**huFolR1**	1,90E+05	1,15E-02	60 nM
	cyFolR1	3,93E+05	3,28E-02	80 nM
R50S/K53A	**huFolR1**	3,28E+05	1,97E-02	60 nM
	cyFolR1	5,50E+05	4,55E-02	80 nM
S35H/wt	**huFolR1**	1,32E+05	5,68E-03	40 nM
	cyFolR1	2,23E+05	1,24E-02	55 nM
R50S/S93A	**huFolR1**	1,25E+05	3,23E-03	30 nM
	cyFolR1	4,39E+05	7,80E-03	20 nM
W96Y/S93A	**huFolR1**	6,55E+05	1,89E-02	30 nM
	cyFolR1	6,25E+05	1,74E-02	30 nM
G49S/S93A	**huFolR1**	1,52E+05	3,06E-03	20 nM
	cyFolR1	3,58E+05	6,22E-03	20 nM
W96Y/wt	**huFolR1**	1,29E+05	2,13E-03	20 nM
	cyFolR1	1,73E+05	2,11E-03	10 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	2,44E+06	1,37E-02	6 nM
	cyFolR1	4,12E+06	2,15E-02	5 nM
	muFolR1	4,86E+05	1,20E-03	2,5 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	1,41E+05	4,25E-04	3 nM
	cyFolR1	1,78E+05	6,39E-04	3,5 nM

Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 42).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 10000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 200 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,35 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 42: Unión monovalente (afinidad) de doce moléculas de unión a FolR1 variantes de 16D5 sobre FolR1 de ser humano, de cinomolgo y murino.

Ligando Variante de HC/variante de LC	**Analito**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD**
W98Y/K53A	**huFolR1**			Sin unión
S35H/K53A	**huFolR1**			Unión débil
W96Y/K53A	**huFolR1**			Unión débil
W98Y/wt	**huFolR1**			5400 nM (estado estacionario)
G49S/K53A	**huFolR1**	9,19E+03	1,74E-02	1900 nM
R50S/K53A	**huFolR1**	1,35E+04	2,45E-02	1800 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	5,00E+04	8,57E-02	1700 nM
S35H/S93A	**huFolR1**	8,43E+03	1,12E-02	1300 nM

Ligando Variante de HC/variante de LC	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
S35H/wt	**huFolR1**	8,96E+03	1,13E-02	1200 nM
R50S/S93A	**huFolR1**	1,57E+04	1,23E-02	780 nM
G49S/S93A	**huFolR1**	1,05E+04	7,99E-03	760 nM
W96Y/wt	**huFolR1**	9,95E+03	5,44E-03	550 nM
W96Y/S93A	**huFolR1**	4,05E+04	1,72E-02	420 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	1,18E+04	7,22E-04	60 nM

Se analizaron doce variantes de afinidad reducida de la molécula de unión a FolR1 16D5 mediante resonancia de plasmón superficial en comparación con la molécula de unión de tipo silvestre 16D5 y la molécula de unión 36F2. El objetivo era encontrar una variante de 16D5 con una afinidad y una avidez comparables a 36F2. Cuando se midió la unión monovalente (afinidad) hubo doce variantes con una afinidad mayor y variantes con una afinidad menor que 36F2. Sin embargo, en la unión bivalente (avidez) todas las variantes tienen un valor de KD aparente mayor que 36F2. Esto se debe principalmente a la rápida velocidad de asociación (ka) de 36F2 que da como resultado una KD aparente pequeña para 36F2. El gran efecto de avidez cuando 36F2 se une de manera bivalente parece ser único para esta molécula de unión. Como se ha indicado anteriormente, 36F2 fue la única molécula de unión con reactividad cruzada con ser humano, murino y cinomolgo que pudo identificarse.

Ejemplo 45

Unión de variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HeLa

La unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y diversas variantes HC/LC de 16D5 a FolR1 humano se evaluó en células Hela. En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (229 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG

humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure conjugado a PE (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-116-170). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío y BSA al 0,1 % se fijaron con PFA al 1 % durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 32A-E). El TCB 36F2 se unió a FolR2, no fue bien tolerado por los ratones, y no mostró la eficacia deseada.

Ejemplo 46

Producción y purificación de cuatro variantes de la molécula biespecífica de células T 16D5 con mutaciones para reducir la afinidad a FolR1 de ser humano y de cinomolgo:

TCB 16D5 G49S/S93A, G49S/K53A, W96Y, W96Y/D52E

Transfección y producción transitoria

Se produjeron de manera transitoria cuatro variantes adicionales de TCB 16D5 que tenían afinidad reducida a FolR1 en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Para la transfección, se cultivan las células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo Excell que contiene L-glutamina 6 mM y 250 mg/l de medio de cultivo G418. Para la producción en matraces Tubespin de 600 (volumen máximo de trabajo 400 ml) se sembraron 600 millones de células HEK293 EBNA 24 antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 400 µg de ADN. Después de la adición de 1080 µl de solución de PEI (2,7 µg/ml) se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz Tubespin de 600 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 360 ml de Excell + L-glutamina 6mM + 5g/l Pepsoy + medio VPA 1,0 mM y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade Feed 7 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 20 - 30 min a 3600 x g (centrifugadora Sigma 8K), la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

Purificación

Las variantes de afinidad reducida de TCB 16D5 se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de

proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna HiTrap proteína A (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 5 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, citrato de sodio 20 mM). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 20 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron hasta 1 ml usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Se agruparon las fracciones que contenían menos del 2 % de oligómeros. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 43: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de las variantes de 16D5 de afinidad reducida en el formato biespecífico de célula T.

Nombre	**Mutaciones para reducir la afinidad**	**Rendimiento [mg/l]**	**Monómero [%]**	**Pureza mediante CE-SDS [%]**
TCB 16D5	G49S S93A	10,3	100	88
TCB 16D5	G49S K53A	22,3	98,5	96
TCB 16D5	W96Y	15,2	98,7	92,5
TCB 16D5	W96Y D52E	9,9	99,3	92,9
TCB 16D5	Tipo silvestre	5,4	96	91,6

Todas las variantes con afinidad reducida pudieron producirse con buena calidad.

Ejemplo 47

Unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y las dos variantes de afinidad reducida de 16D5, TCB 16D5 W96Y/D52E y TCB 16D5 G49S/S93A a FolR1 expresado en células HeLa

La unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y las dos variantes de afinidad reducida de 16D5, TCB 16D5 W96Y/D52E y TCB 16D5 G49S/S93A a FolR1 se evaluó en células HeLa. En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (30 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure conjugado a FITC (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-096-098). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío con BSA al 0,1% se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 33).

Ejemplo 48

Producción y purificación de tres moléculas biespecíficas de célula T con afinidad intermedia a Folr1 de ser humano y de cinomolgo: 14B1, 6E10, 2C7

Transfección y producción transitoria

Los TCB de afinidad intermedia se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Para la transfección, se cultivan las células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo Excell que contiene L-glutamina 6 mM y 250 mg/l de medio de cultivo G418. Para la producción en matraces Tubespin de 600 (volumen máximo de trabajo 400 ml) se sembraron 600 millones de células HEK293 EBNA 24 antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 400 µg de ADN. Después de la adición de 1080 µl de solución de PEI (2,7 µg/ml) se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz Tubespin de 600 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 360 ml de Excell + L-glutamina 6mM + 5g/l Pepsoy + medio VPA 1,0 mM y

las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade Feed 7 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 20 - 30 min a 3600 x g (centrifugadora Sigma 8K), la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

Purificación

Los TCB de afinidad intermedia se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna HiTrap proteína A (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 5 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, citrato de sodio 20 mM). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 20 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron hasta 1 ml usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Se agruparon las fracciones que contenían menos del 2 % de oligómeros. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 44: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de los TCB de afinidad intermedia.

Nombre	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
TCB 6E10	2,3	93	95
TCB 14B1	1,8	94	70
TCB 9C7	3,4	98	99

Se pudieron producir todas las moléculas biespecíficas de célula T de afinidad intermedia. Los rendimientos no son altos. La calidad es buena para 9C7 y aceptable para 14B1 y 6E10.

Ejemplo 49

Unión de variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HT-29

La unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y diversas variantes HC/LC (Figura 34A-E) de 16D5 a FolR1 humano se evaluó en células HT-29. En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (229 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure conjugado a PE (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-116-170). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío y BSA al 0,1 % se fijaron con PFA al 1 % durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Figuras 34A-E).

Ejemplo 50

Unión de moléculas de unión a FolR1 intermedias a FolR1 y FolR2 de ser humano y de ratón

La reactividad cruzada de las moléculas de unión a FolR1 intermedias (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), así como de TCB 16D5 y TCB 36F2 a FolR1 y FolR2 de ser

humano y de cinomolgo se evaluó en un ensayo de unión FACS en células HEK293T transfectadas.

En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con 100 nM de los anticuerpos biespecíficos. Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcγ de cabra anti-IgG humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure de fluoresceína (FITC) (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-096-098). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío y BSA al 0,1 % se fijaron con PFA al 1 % durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las gráficas se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 33).

Los resultados muestran que TCB 36F2 y TCB 14B1 tienen reactividad cruzada con FolR1 de ratón y con FolR2 humano y de ratón. Puede observarse una unión débil a FolR2 para TCB 6E10 TCB. TCB 16D5 y TCB 9C7 son específicos para FolR1 humano y no muestran reactividad cruzada con FolR1 de ratón o FolR2 de ser humano y de ratón.

Ejemplo 51

Caracterización bioquímica mediante resonancia de plasmón superficial de variantes de afinidad reducida de 16D5 y moléculas de unión de afinidad intermedia adicionales en el formato biespecífico de célula T

La unión de variantes de afinidad reducida de 16D5 anti-FolR1 y moléculas de unión de afinidad intermedia adicionales en el formato biespecífico de célula T al receptor 1 de folato recombinante humano, de cinomolgo y murino (todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, GE Healthcare). Las moléculas usadas para la determinación de la afinidad y la avidez se describen en la tabla 45.

Tabla 45: Nombre, descripción y referencia de figura de nueve construcciones usadas en el análisis SPR.

Nombre	Descripción	Referencia de figura
Variantes de afinidad reducida de 16D5 TCB 16D5 TCB 16D5 G49S/S93A TCB 16D5 G49S/K53A TCB 16D5 W96Y TCB 16D5 W96Y/D52E	formato invertido, biespecífico de célula T 2+1 (cadena ligera común)	Fig. 1 A
Moléculas de unión de afinidad intermedia TCB 36F2 TCB 6E10 TCB 14B1 TCB 9C7	crossfab, formato invertido, biespecífico de célula T 2+1	Fig. 1F

Inyecciones individuales

En primer lugar se analizaron los TCB anti-FolR1 mediante inyecciones individuales (tabla 46) para caracterizar su reactividad cruzada (con FolR1 humano, murino y de cinomolgo) y su especificidad (para FolR1 humano, FolR2 humano, FolR3 humano). Se acoplaron directamente fusiones a Fc monoméricas de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) de ser humano, cinomolgo y murino o de receptor 2 y 3 de folato humano (FolR2-Fc, FolR3-Fc) sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Los TCB se inyectaron durante 60 segundos a una concentración de 500 nM.

Tabla 46: Reactividad cruzada y especificidad de 7 moléculas biespecíficas de célula T para receptor 1 de folato. + significa unión, - significa sin unión, +/- significa unión débil.

Nombre del clon	Unión a huFolR1	Unión a cyFolR1	Unión a muFolR1	Unión a huFolR2	Unión a huFolR3
TCB 16D5	+	+	-	-	-
TCB 16D5 G49S/S93A	+	+	-	-	-
TCB 16D5 W96Y/D52E	+	+	-	-	-

TCB 36F2	+	+	+	+/-	-
TCB 6E10	+	+	-	-	-
TCB 14B1	+	+	+	+/-	-
TCB 9C7	+	+	-	-	-

Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 47).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, GE Healthcare). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 200-300 UR. Las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 se pasaron a una concentración de 11,1 a 900 nM (para las variantes de afinidad reducida de 16D5) o de 0,2 a 500 nM (para las moléculas adicionales de afinidad intermedia y para 36F2) con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 240 o 600 segundos. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 30 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de IL2R murino-Fc biotinilada recombinante (receptor fusionado a Fc no relacionado). Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 47: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 (TCB) a FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
TCB 16D5	**huFolR1**	1,68E+05	4,33E-04	3 nM
	cyFolR1	2,08E+05	6,95E-04	3 nM
TCB 16D5 G49S/S93A	**huFolR1**	1,49E+05	2,09E-03	10 nM
	cyFolR1	4,54E+05	7,84E-03	20 nM

TCB 16D5 G49S/K53A	**huFolR1**	1,32E+05	5,86E-03	40 nM
	cyFolR1	3,73E+05	2,56E-02	70 nM
TCB 16D5 W96Y	**huFolR1**	1,15E+05	1,44E-03	10 nM
	cyFolR1	1,37E+05	1,68E-03	10 nM
TCB 16D5 W96Y/D52E	**huFolR1**	1,24E+05	1,40E-03	10 nM
	cyFolR1	5,17E+05	1,41E-02	30 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	1,12E+06	7,90E-03	7 nM
	cyFolR1	1,97E+06	1,10E-02	6 nM
	muFolR1	5,54E+05	1,47E-03	3 nM
TCB 6E10	**huFolR1**	7,93E+06	8,74E-03	1 nM
	cyFolR1	5,56E+06	5,72E-03	1 nM
TCB 14B1	**huFolR1**	1,12E+06	1,40E-03	1 nM
	cyFolR1	1,02E+06	1,66E-03	2 nM
	muFolR1	8,03E+06	$8{,}20E^{-04}$	0,1 nM
TCB 9C7	**huFolR1**	1,18E+06	1,42E-03	1 nM
	cyFolR1	4,98E+06	4,82E-03	1 nM

3. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 48).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 12000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,3 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano, de cinomolgo o murino a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 2,1. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). Para las cinéticas de afinidad con fases de asociación y

disociación demasiado rápidas como para ajustarlas a un modelo de unión de Langmuir 1:1, se aplicó el modelo de análisis de estado estacionario usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). El análisis de estado estacionario proporciona la KD de la reacción de unión en el equilibrio.

Tabla 48: Unión monovalente (afinidad) de moléculas biespecíficas de célula T (TCB) anti-FolR1 a FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
TCB 16D5	**huFolR1**	1,22E+04	7,02E-04	57 nM
	cyFolR1	1,29E+04	1,71E-03	130 nM
TCB 16D5 G49S/S93A	**huFolR1**	1,01E+04	8,37E-03	830 nM
	cyFolR1	2,05E+04	8,60E-03	420 nM
TCB 16D5 G49S/K53A	**huFolR1**	9,17E+03	1,59E-02	1700 nM
	cyFolR1			1900 nM (análisis de estado estacionario)
TCB 16D5 W96Y	**huFolR1**	1,11E+04	4,05E-03	370 nM
	cyFolR1	1,17E+04	5,16E-03	440 nM
TCB 16D5 W96Y/D52E	**huFolR1**			1400 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			5600 nM (análisis de estado estacionario)
TCB 36F2	**huFolR1**			1400 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			1500 nM (análisis de estado estacionario)
	muFolR1	3,50E+04	1,73E-02	490 nM

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
TCB 6E10	**huFolR1**			1200 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			1500 nM (análisis de estado estacionario)
TCB 14B1	**huFolR1**	6,16E+04	3,03E-02	490 nM
	cyFolR1			1200 nM (análisis de estado estacionario)
	muFolR1	7,03E+04	2,28E-03	30 nM
TCB 9C7	**huFolR1**			840 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			1400 nM (análisis de estado estacionario)

Las mutaciones introducidas en las moléculas de unión a 16D5 reducen su afinidad a FolR1 de ser humano y de cinomolgo tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial. La clasificación con afinidad descendente es 16D5 WT (57 nM)> W96Y (6,5 veces menor)> G49S/S93A (14,5 veces menor)> W96Y/D52E (24,5 veces menor)> G49S/K53A (30 veces menor). Se puede observar la misma clasificación en los valores de avidez, aunque las diferencias de número de veces son menores, 16D5 WT (3nM)> W96Y, G49S/S93A, W96Y/D52E (3 veces menor)> G49S/K53A (13 veces menor).

Las moléculas de unión de afinidad intermedia tienen la siguiente clasificación en cuanto a su afinidad 16D5 (57 nM)>14B1 (8,5 veces menor)> 9C7 (15 veces menor) > 6E10 (21 veces menor)>36F2 (24,5 veces menor). Estas diferencias, sin embargo, desaparecen en la medida de avidez, 14B1, 9C7, 6E10 (1nM)> 16D5 (3 nM) > 36F2 (7 nM).

El TCB 16D5 W96Y/D52E aborda los problemas observados con candidatos

anteriores. TCB 16D5 W96Y/D52E está basado en la molécula de unión 16D5 de cadena ligera común y tiene dos mutaciones puntuales en la cadena pesada respecto de la molécula de unión 16D5 progenitora. La mutación W96Y reduce la afinidad de la molécula de unión a FolR1 en comparación con la molécula de unión progenitora y la mutación D52E elimina el sitio de desamidación y también contribuye a la reducción de la afinidad. TCB 16D5 W96Y/D52E se une a FolR1 de ser humano y de cinomolgo, pero no a FolR1 murino. Es específico para FolR1 y no se une a FolR2 humano recombinante o a FolR3 humano. La afinidad (unión monovalente) de 16D5 W96Y/D52E es de aproximadamente 1,4 µM para FolR1 humano (24.5 veces menor que la molécula de unión 16D5 progenitora) y la avidez (unión bivalente) de aproximadamente 10 nM (3 veces menor que la molécula de unión 16D5 progenitora).

Ejemplo 52

Eliminación de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por TCB de FolR1 intermedios

La eliminación por células T mediada por moléculas de unión a FolR1 intermedias (CB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), se evaluó en células Hela (FolR1 alto), SKov-3 (FolR1 medio) y HT-29 (FolR1 bajo). TCB 16D5 y TCB 36F2 se incluyeron como puntos de referencia. Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h y 48 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 10 nM en triplicados). Los PBMC

se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h y 48 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados demuestran que la lisis tumoral inducida por las moléculas de unión a FolR1 intermedias (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7) varía entre la obtenida para el TCB 16D5 de alta afinidad y la del TCB 36F2 de baja afinidad (Fig. 36A-F). Entre las moléculas de unión a FolR1 intermedias, TCB 14B1 muestra la eliminación más fuerte, tal como se puede observar tras 48 h de incubación (Fig. 36D-F). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación tras 24 h y 48 h de incubación, calculados usando GraphPadPrism6, se proporcionan en la tabla 49 y en la tabla 50.

Tabla 49: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por los TCB intermedios de FolR1 tras 24 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 6E10	6,5	n.d.	*n.d.
TCB 14B1	8,5	30,1	*n.d.
TCB 9C7	2,8	741,4	*n.d.
TCB 16D5	2,2	1,5	*n.d.
TCB 36F2	31,1	*n.d.	*n.d.

** No determinado*

Tabla 50: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por los TCB intermedios de FolR1 tras 48 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 6E10	2,1	2164,0	*n.d.
TCB 14B1	5,5	4,7	397,7

TCB 9C7	4,3	519,6	*n.d.
TCB 16D5	2,3	*n.d.	4,9
TCB 36F2	10,5	*n.d.	n.d.

** No determinado*

Ejemplo 53

Eliminación por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por las variantes de 16D5 de afinidad reducida

La eliminación por células T mediada por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5-G49S/K53A, TCB 16D5 W96Y, TCB 16D5 W96Y/D52E) se evaluó en células HeLa (FolR1 alto), SKov-3 (FolR1 medio) y HT-29 (FolR1 bajo). TCB 16D5 y TCB 36F2 se incluyeron como puntos de referencia. El ensayo se efectuó tal como se describe anteriormente (ejemplo 52).

Los resultados demuestran que la lisis tumoral inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5-G49S/K53A, TCB 16D5 W96Y, TCB 16D5 W96Y/D52E), varía entre la obtenida para el TCB 16D5 de alta afinidad y el TCB 36F2 de baja afinidad. Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación tras 24 h y 48 h de incubación, calculados usando GraphPadPrism6, se proporcionan en la tabla 51 y en la tabla 52 (Fig. 37A-F).

Tabla 51: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 que expresan FolR1 inducida por TBC 16D5 y sus variantes de afinidad reducida tras 24 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 16D5	2,2	1,5	*n.d.
TCB 16D5-G49S/S93A	2,3	430,4	*n.d.
TCB 16D5-G49S/K53A	4,4	1701,9	*n.d.
TCB 16D5 W96Y	3,0	164,5	*n.d.
TCB 16D5 W96Y/D52E	1,3	235,4	*n.d.
TCB 36F2	31,1	*n.d.	*n.d.

** No determinado*

Tabla 52: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 que expresan FolR1 inducida por TBC 16D5 y sus variantes de afinidad reducida tras 48 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 16D5	2,3	0,1	4,9
TCB 16D5-G49S/S93A	0,9	95,9	99,3
TCB 16D5-G49S/K53A	0,5	950,4	1790,7
TCB 16D5 W96Y	1,8	24,7	99,3
TCB 16D5 W96Y/D52E	0,9	93,0	399,4
TCB 36F2	10,5	968,5	*n.d.

** No determinado*

Por lo tanto, al igual que con el TCB 36F2 FOLR1 descrito anteriormente, El TCB 16D5 W96Y/D52E diferencia entre células de alta y baja expresión, lo que es de especial importancia para reducir la toxicidad, y que las células de algunos tejidos normales, no tumorales expresan niveles muy bajos de FolR1 (aproximadamente menos de 1000 copias por célula). De manera coherente con esta observación, los resultados discutidos en el ejemplo 54 más adelante demuestran que el TCB 16D5 W96Y/D52E induce niveles mucho más bajos de eliminación mediada por células T de células primarias (Fig. 38A-F) en comparación con el TCB 16D5 progenitor. Como tales, los TCB 16D5 W96Y/D52E median una eliminación potente de tejidos tumorales con expresión alta o media de FolR1, pero no de tejidos normales con baja expresión. TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 comprende restos de unión a FolR1 de relativamente baja afinidad pero posee un efecto de avidez que permite diferenciar entre células con alta y baja expresión de FolR1. Debido a que las células tumorales expresan FolR1 a niveles elevados o intermedios, este TCB se une de manera selectiva a células tumorales y no a células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto. Como ventaja adicional frente al TCB de FolR1 36F2 descrito anteriormente, el TCB 16D5 W96Y/D52E se une específicamente a FolR1 y no a FolR2 o FolR3, potenciando adicionalmente su seguridad para tratamiento *in vivo*.

Además de las características ventajosas anteriores, el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato invertido bivalente 2+1 tiene también la ventaja de que no necesita

reticulación química u otra estrategia híbrida. Esto lo hace adecuado para la fabricación de un medicamento para tratar a pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen tumores cancerosos positivos a FolR1. El TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato invertido bivalente 2+1 puede producirse usando procesos de CHO convencionales con bajos agregados. Además, el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 comprende secuencias humanas y humanizadas, haciéndolo superior a las moléculas que emplean polipéptidos de rata y murinos que son altamente inmunogénicos cuando se administran a seres humanos. Además, el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 se diseñó por ingeniería genética para suprimir la unión a FcgR y, como tal, no causa reticulación con FcgR y reacciones a la infusión, potenciando además su seguridad cuando se administra a pacientes.

Tal como se ha demostrado por los resultados descritos anteriormente, su geometría de cabeza a cola hace que el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato invertido bivalente 2+1 sea una molécula altamente potente que induce la eliminación absoluta de la célula diana. Su bivalencia magnifica la avidez y la potencia, pero también permite diferenciar entre células con alta y baja expresión. Su preferencia por células de expresión alta o media de diana debido a su efecto de avidez reduce la toxicidad resultante de la eliminación mediada por células T de células normales que expresan FolR1 a niveles bajos.

Una ventaja adicional del TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 y otras realizaciones divulgadas en el presente documento es que su desarrollo clínico no necesita del uso de moléculas subrogadas ya que se unen a FolR1 humano y de cinomolgo. Como tales, las moléculas divulgadas en el presente documento reconocen un epítopo distinto al de los anticuerpos para FolR1 descritos anteriormente que no reconocían a FolR1 de ambas especies (véase también la Fig. 41).

Ejemplo 54

Eliminación por células T de células primarias inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida y TCB de FolR1 de afinidad intermedia

La eliminación por células T mediada por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E) y la molécula de unión a FolR1 intermedia TCB 14B1 se evaluó en células primarias (células epiteliales corticales renales humanas (HRCEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 4110) y células epiteliales pigmentarias retinales humanas (HRPEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 6540)). Se incluyeron células HT-29 (FolR1 bajo) como línea celular de control. TCB 16D5 y TCB 36F2 se incluyeron como puntos de

referencia y TCB DP47 sirvió como control sin unión.

El ensayo se llevó a cabo tal como se describe en el ejemplo 52, con un intervalo de concentración de los anticuerpos de 0,1 pM – 100 nM (en triplicados).

Cuando se usan células primarias humanas como diana, la lisis general es mucho más baja debido a una velocidad de expresión menor de FolR1 en estas células (Fig. 38A-F). Para la molécula de unión a FolR1 de alta afinidad TCB 16D5 puede observarse una lisis mediada por células T en ambos tipos de células primarias empleados. Tal como se observó previamente cuando se usaron líneas celulares tumorales como diana, la lisis inducida por la molécula de unión a FolR1 intermedia TCB 14B1 y las variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E), varía entre la obtenida para el TCB 16D5 de alta afinidad y el TCB 36F2 de baja afinidad. La lisis significativamente reducida de las células que expresan FolR1 a bajos niveles es consistente con la baja actividad fuera de la diana y se espera que las variantes de 16D5 de baja afinidad TCB 16D5-G49S/S93A y TCB 16D5 W96Y/D52E, por lo tanto, se toleren bien *in vivo*.

Ejemplo 55

FC de una sola dosis de construcciones de TCB de FOLR1 en ratones NOG hembra

Se mantuvieron ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) hembra de una media de edad de 8-10 semanas al inicio del experimento (comprados a través de Taconic, instalación SOPF) en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (ZH193/2014). Tras su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

Se llevó a cabo un estudio farmacocinético de una sola dosis (SDPK) para evaluar la exposición de las construcciones de TCB de FolR1 (36F2, 16D5, 16D5 G49S/S93A y 16D5 W96Y/D52E). Se administró una administración de bolo i.v. de 0,5 mg/kg a ratones NOG y se extrajeron muestras de sangre en momentos seleccionados para la evaluación farmacocinética. Se analizaron mediante ELISA muestras de suero de ratón. Se añadieron paso a paso a-huCD3-CDR biotinilado (mAb<ID-mAb<CD3>>M-4.25.93-IgG-Bi), muestras de ensayo, anticuerpo a-huFc marcado con digoxigenina (mAb<H-FC pan>M-R10Z8E9-IgG-Dig) y anticuerpo de detección anti-digoxigenina (POD) a una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con estreptavidina y se incubaron después de cada etapa durante 1 h a temperatura ambiente. La placa

se lavó tres veces después de cada etapa para eliminar las sustancias no unidas. Finalmente, se visualizó el complejo unido a peroxidasa añadiendo solución de sustrato ABTS para formar un producto de reacción coloreado. La intensidad del producto de reacción, que se determina fotométricamente a 405 nm (con longitud de onda de referencia a 490 nm), es proporcional a la concentración de analito en la muestra de suero. El intervalo de calibración de la curva patrón para las construcciones es de 0,078 a 5 ng/ml, siendo 1,5 ng/ml el límite inferior de cuantificación (LIDC).

El estudio FCDU reveló un perfil FC similar a IgG para las construcciones 16D5, 16D5 W96Y/D52E y 16D5 G49S/S93A (Fig. 39A-B). Debido a esto, se seleccionó una pauta de una vez a la semana para el estudio de eficacia (Fig. 40B). La semivida para 36F2 es menor comparada con los demás clones. 36F2 es la única de las cuatro moléculas ensayadas que tiene reactividad cruzada con FolR1 de ratón, lo que puede explicar la menor semivida para esta molécula e indica una DFMD (disposición de fármaco mediada por diana).

Ejemplo 56

Eficacia *in vivo* de construcciones de TCB de FOLR1 (16D5, 16D5 G49S/S93A y 16D5 W96Y/D52E) tras la transferencia de PBMC humanos en ratones NOG portadores de HeLa

Las construcciones de TCB de FolR1 se ensayaron en la línea celular HeLa de cáncer de cuello de útero humano que expresan FolR1, inyectada por vía s.c. en ratones NOG a los que se les ha injertado PBMC.

Las células HeLa se obtuvieron originariamente de la ATCC (CCL2) y después de su expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche-Glycart. La línea celular de tumor se cultivó de manera rutinaria en RPMI que contenía FCS al 10 % (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO_2 al 5 %. El pase 13 se usó para trasplante, a una viabilidad > 95 %. Se inyectaron 1 x 10^6 células por animal por vía s.c. en el flanco derecho de los animales en un total de 100 µl de medio de cultivo celular RPMI (Gibco).

Se mantuvo a 60 ratones NOG hembra, de 8-10 semanas de edad al comienzo del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) en condiciones libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (ZH193/2014). Tras la llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

De acuerdo con el protocolo del estudio, se inyectó a los ratones por vía s.c, en el día 0 del estudio con 1 x 10^6 células HeLa. En el día 30 del estudio, cuando el tumor

alcanzó un tamaño de aproximadamente 150 mm3, se aislaron PBMC humanos de un donante sano mediante el método de Ficoll y se inyectaron 10 x 10^6 células por vía i.v. en los ratones portadores de tumores. Dos días después (día 32), se aleatorizó a los ratones y se distribuyeron de manera uniforme en seis grupos de tratamiento (n = 10) seguido de inyección por vía i.v. con 16D5 (0,5 mg/kg), 16D5 G49S/S93A (2,5 o 0,5 mg/kg) y 16D5 W96Y/D52E (2,5 o 0,5 mg/kg). Se inyectó a todos los grupos de tratamiento una vez a la semana durante un total de tres semanas. Se inyectaron a los ratones 200 µl de la solución adecuada. Se inyectó a los ratones en el grupo de vehículo con PBS. Para obtener la cantidad adecuada de TCB por cada 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. El crecimiento tumoral se midió una vez a la semana usando un calibre (Figura 40C-E) y se calculó el volumen tumoral del modo siguiente:

V_T: (A2/2) x L (A: Anchura L: Longitud)

La inyección una vez a la semana de las construcciones de TCB de FolR1 dio como resultado una regresión tumoral significativa (Fig. 40C-E). La eficacia de 16D5 (0,5 mg/kg) y 16D5 W96Y/D52E16D5 (0,5 mg/kg) fue comparable, mientras que 16D5 G49S/S93A (0,5 mg/kg) mostró una potencia ligeramente menor. Las dosis mayores de 2,5 mg/kg de 16D5 W96Y/D52E16D5 y de 16D5 G49S/S93A no mostraron una eficacia aumentada en comparación con las dosis de 0,5 mg/kg. Para las lecturas FD, se sacrificó a los ratones en el día 52, se extirparon los tumores, se pesaron y se prepararon suspensiones de células individuales mediante una digestión enzimática con colagenasa V, dispasa II y DNasa para su posterior análisis FACS. Los tumores explantados de todos los grupos de tratamiento mostraron un peso tumoral significativamente menor a la terminación del estudio en comparación con los tumores de control de vehículo (Fig. 40F). Las suspensiones de células individuales de tumores se tiñeron para huCD45 y huCD3 y DAPI para la exclusión de células muertas y se analizaron en el dispositivo BD Fortessa. Los análisis FACS revelaron números estadísticamente mayores de células T humanas positivas a CD3 infiltradas en el tejido tumoral tras el tratamiento con 16D5 así como con 16D5 W96Y/D52E16D5 en comparación con los tumores de control de vehículo (Fig. 40C).

Ejemplo 57

Estudio de toxicidad en mono cinomolgo

Se efectúa un estudio farmacocinético (FC), farmacodinámico (FD) y de tolerabilidad para investigar la tolerabilidad, FC y efectos FD de una sola dosis intravenosa de TCB variantes de 16D5 de afinidad reducida (por ejemplo, TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E) en monos cinomolgos. En este estudio, los monos cinomolgos no expuestos previamente, (1 mono macho y 1 mono hembra/grupo),

reciben una sola dosis intravenosa de TCB variante de 16D5 de afinidad reducida, que incluye TCB 16D5 W96Y/D52E, siguiendo un protocolo de escalado de la dosis. Los niveles de dosificación ejemplares incluyen 0,003, 0,03, y 0,09 mg/kg. Se evaluaron parámetros de toxicidad convencionales (signos clínicos, pesos corporales, química hematológica y clínica) y las cinéticas de los números de células T y su estado de activación en sangre y la cinética de liberación de citocinas. También se recogen muestras de sangre para FC durante un periodo de 28 días para medir los TCB variantes de 16D5 de afinidad reducida, que incluye TCB 16D5 W96Y/D52E, de anticuerpos anti-fármaco.

Secuencias de aminoácidos de realizaciones ejemplares

1) Moléculas de unión a FolR en formato de cadena ligera común, cadena pesada variable

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16A3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYAGVTPFDYWGQGTLVTVSS	1
18D3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYTGGSSAFDYWGQGTLVTVS	2
15H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYLFSTSFDYWGQGTLVTVSS	3
15B6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYIGIVPFDYWGQGTLVTVSS	4
21D1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYVGVSPFDYWGQGTLVTVSS	5

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16F12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNFTVLRVPFDYWGQGTLVTVSS	6
15A1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYIGVVTFDYWGQGTLVTVSS	7
15A1_CDR1	SYYMH	8
15A1_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
15A1_CDR3	NYYIGVVTFDY	10
19E5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEWRRYTSFDYWGQGTLVTVSS	11
19E5_CDR1	SYYMH	8
19E5_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19E5_CDR3	GEWRRYTSFDY	12
19A4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWIRWEHFDYWGQGTLVTVSS	13
19A4_CDR1	SYYMH	8
19A4_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19A4_CDR3	GGWIRWEHFDY	14

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	15
16D5_CDR1	NAWMS	16
16D5_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
16D5_CDR3	PWEWSWYDY	18
15E12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSYFDYWGQGTLVTVSS	19
15E12_CDR1	NAWMS	16
15E12_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
15E12_CDR3	PWEWSYFDY	20
21A5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWAWFDYWGQGTLVTVSS	21
21A5_CDR1	NAWMS	16
21A5_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21A5_CDR3	PWEWAWFDY	22
21G8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWAYFDYWGQGTLVTVSS	23
21G8_CDR1	NAWMS	16

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
21G8_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21G8_CDR3	PWEWAYFDY	24
19H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARTGWSRWGYMDYWGQGTLVTVSS	25
19H3_CDR1	SYYMH	8
19H3_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19H3_CDR3	TGWSRWGYMDY	26
20G6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEWIRYYHFDYWGQGTLVTVSS	27
20G6_CDR1	SYYMH	8
20G6_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
20G6_CDR3	GEWIRYYHFDY	28
20H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVGWYRWGYMDYWGQGTLVTVSS	29
20H7_CDR1	SYYMH	8
20H7_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
20H7_CDR3	VGWYRWGYMDY	30

2) cadena ligera común (CLC) de molécula de unión a CD3

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena ligera de CD3 común (VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
cadena ligera CD3 común_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
cadena ligera CD3 común_CDR2	GTNKRAP	33
cadena ligera CD3 común_CDR3	ALWYSNLWV	34
cadena ligera de CD3 común (VLCL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	35

3) molécula de unión a CD3, cadena pesada

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena pesada variable de CD3 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	36
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR1	TYAMN	37

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	38
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR3	HGNFGNSYVSWFAY	39
cadena pesada completa de CD3 (VHCH1)_	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	40
cadena pesada constante de CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	84

4) Moléculas de unión a FolR útiles para formato crossfab

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
11F8_VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYRAWYSFDYWGQGTTVTVSS	41
11F8_VH_CDR1	SYAIS	42
11F8_VH_CDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG	43
11F8_VH_CDR3	AVFYRAWYSFDY	44

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
11F8_VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYTSPPPTFGQGTKVEIK	45
11F8_VL_CDR1	RASQSISSWLA	46
11F8_VL_CDR2	DASSLES	47
11F8_VL_CDR3	QQYTSPPPT	48
36F2_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLVTVSS	49
36F2_VH_CDR1	SYYMH	8
36F2_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
36F2_VH_CDR3	SFFTGFHLDY	50
36F2_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYTNEHYYTFGQGTKVEIK	51
36F2_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
36F2_VL_CDR2	GASSRAT	53
36F2_VL_CDR3	QQYTNEHYYT	54
5D9_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSYIDMDYWGQGTLVTVSS	70
5D9_VH_CDR1	SYYMH	8
5D9_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
5D9_VH_CDR3	SYIDMDY	71
5D9_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDNWSPTFGQGTKVEIK	72
5D9_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
5D9_VL_CDR2	GASSRAT	53
5D9_VL_CDR3	QQDNWSPT	73
6B6_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVDMDYWGQGTLVTVSS	74
6B6_VH_CDR1	SYYMH	8
6B6_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
6B6_VH_CDR3	SYVDMDY	75
6B6_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDIWSPTFGQGTKVEIK	76
6B6_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
6B6_VL_CDR2	GASSRAT	53
6B6_VL_CDR3	QQDIWSPT	77
14E4_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSSYVEWYAFDYWGQGTLVTVSS	78
14E4_VH_CDR1	SYAMS	79

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
14E4_VH_CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG	80
14E4_VH_CDR3	DSSYVEWYAFDY	81
14E4_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDSTLTIS RLEPEDFAVYYCQQPTSSPITFG QGTKVEIK	82
14E4_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
14E4_VL_CDR2	GASSRAT	53
14E4_VL_CDR3	QQPTSSPIT	83

5) molécula de unión a CD3 útil en formato crossfab

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena pesada de CD3 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWV RQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS	36
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR1	TYAMN	37
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	38

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR3	HGNFGNSYVSWFAY	39
cadena ligera de CD3 (VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
cadena ligera CD3_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
cadena ligera CD3_CDR2	GTNKRAP	33
cadena ligera CD3_CDR3	ALWYSNLWV	34
pETR12940: cadena ligera común de CD3 (VLCH1)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	86
cadena pesada de CD3 cruzada (VHC□); por ejemplo, en pCON1057	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	87
CD3- CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	85

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
CD3-ckappa	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	88

6) **–** Secuencias de aminoácidos ejemplares de anticuerpos biespecíficos de CD3-FolR en formato 2+1 crossmab invertido

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VLCH1[CD3] pETR12940	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	86
CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD	307
VHCH1[36F2]_VHCL[CD3]_Fc pomo_PGLALA pCON1056	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	308

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2-Fc agujero PGLALA pCON1050	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWV RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	309
36F2 LC pCON1062	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYTNEHYYTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHXGLSSPVTKSFNRGEC	310
CD3 VLCH1 pETR12940	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	86

7) Secuencias de aminoácidos ejemplares de anticuerpos biespecíficos de CD3-FolR con cadena ligera común

VHCH1[16D5]_VHCH1[CD3]_Fcpomo pCON999	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	89
VHCH1[16D5]_Fcagujero pCON983	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSL SLSPGK	90
CD3_cadena ligera común pETR13197	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	35

VHCH1[CD3]_VHCH1[16D5]_Fcpomo_PGLALA pETR13932	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIK SKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKT EDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	91
CD3_Fcpomo_PGLALA pETR13917	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	92

Fc_agujero_PGLALA_HYRF pETR10755	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	93
VHCL[CD3]_Fcpomo_PGLALA pETR13378	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	98

16D5 invertido 2+1 con N100A en CDR H3 pETR14096	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	99
16D5 invertido 2+1 con S100aA en CDR H3 pETR14097	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRHGNFGNAYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	100

cadena ligera de CD3 fusionada a CH1; Fc_PGLALA; pETR13862	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	101
16D5 VH fusionado a cadena kappa constante; pETR13859	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	102
CD3 VH fusionado a cadena lambda constante; pETR13860	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSASPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS	103
IGHV1-46*01 (X92343), más elemento JH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSGGSFDYW GQGTLVTVSS	104
IGHV1-69*06 (L22583), más elemento JH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSGGSMDAWGQG TTVTVSS	105

IGHV3-15*01 (X92216), más elemento JH4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	106
IGHV3-23*01 (M99660), más elemento JH4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	107
IGHV4-59*01 (AB019438), más elemento JH4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	108
IGHV5-51*01 (M99686), más elemento JH4	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	109
anticuerpo específico de CD3 basado en la cadena ligera humanizada CH2527	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	110
hVK1-39 (JK4 elemento J)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK	111

VL7_46-13 (cadena ligera de anticuerpo anti-CD3 humanizado)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	112

8) Variantes 16D5 ejemplares con afinidad reducida

a. Variantes de cadena ligera ejemplares con afinidad reducida

Nombre	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
K53A aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSNYAN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTNARAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**ALWYSNLWV**FGGGTKLTVL	113
K53A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
K53A_VL_CDR2	GTNARAP	311
K53A_VL_CDR3	ALWYSNLWV	34
S93A aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSNYAN**WVQQKPGQAPRGLIG**GTNKRAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**ALWYANLWV**FGGGTKLTVL	114
S93A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
S93A_VL_CDR2	GTNKRAP	33
S93A_VL_CDR3	ALWYANLWV	312

b. Variantes de cadena pesada ejemplares con afinidad reducida

Nombre	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
S35H aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMH**WVRQAPGKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	115

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
S35H_VH_CDR1	NAWMH	313
S35H_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
S35H_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
G49S aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAPGKGLEWV**SRIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	116
G49S_VH_CDR1	NAWMS	16
G49S_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
G49S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
R50S aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAPGKGLEWVG**SIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	117
R50S_VH_CDR1	NAWMS	16
R50S_VH_CDR2	SIKSKTDGGTTDYAAPVKG	314
R50S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
W96Y aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAPGKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PYEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	118
W96Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W96Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W96Y_VH_CDR3	PYEWSWYDY	315

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W98Y aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WV RQAPGKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEYSWYDY**WGQ GTLVTVSSAS	119
W98Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W98Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W98Y_VH_CDR3	PWEYSWYDY	232

9) Realizaciones ejemplares adicionales generadas a partir de una biblioteca de presentación en fagos (CDR subrayadas)

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
90D7 aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**NYTIVVSPFDY**WGQG TLVTVSSAS	120
90D7_VH_CDR1	SYYMH	8
90D7_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
90D7_VH_CDR3	NYTIVVSPFDY	233
90C1 aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**NYFIGSVAMDY**WGQ GTLVTVSSAS	121
90C1_VH_CDR1	SYYMH	8
90C1_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
90C1_VH_CDR3	NYFIGSVAMDY	234

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
5E8 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GLTYSMDY**WGQGTL VTVSSAS	122
5E8_VH_ CDR1	SYYMH	8
5E8_VH_ CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
5E8_VH_ CDR3	GLTYSMDY	235
5E8 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC**MQALQIPNT**FGQGTKVEIKRT	123
5E8_VL_ CDR2	LGSNRAS	60
5E8_VL_ CDR3	MQALQIPNT	236
12A4 VH aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVR QAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YAYALDY**WGQGTLVTV SSAS	124
12A4_VH _CDR1	SYAMS	79
12A4_VH _CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG	80
12A4_VH _CDR3	YAYALDY	237
12A4 VL aa	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQ KPGQAPRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC**QQHGSSST**FGQGTKVEIKRT	125
12A4_VL _CDR1	RASQSVSSSYLA	52
12A4_VL _CDR2	GASSRAT	53
12A4_VL _CDR3	QQHGSSST	238

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
7A3 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GDFSAGRLMDY**WG QGTLVTVSSAS	126
7A3_VH_ CDR1	SYYMH	8
7A3_VH_ CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
7A3_VH_ CDR3	GDFSAGRLMDY	239
7A3 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPPIT**FGQGTKVEIKRT	127
7A3_VL_ CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
7A3_VL_ CDR2	LGSNRAS	60
7A3_VL_ CDR3	MQALQTPPIT	240
6E10 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GDYNAFDY**WGHGTL VTVSSAS	128
6E10_VH _CDR1	SYYMH	8
6E10_VH _CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
6E10_VH _CDR3	GDYNAFDY	241
6E10 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC**MQAWHSPT**FGQGTKVEIKRT	129
6E10_VL _CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
6E10_VL _CDR2	LGSNRAS	60

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
6E10_VL_CDR3	MQAWHSPT	242
12F9 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GATYTMDY**WGQGTLVTVSSAS	130
12F9_VH_CDR1	SYYMH	8
12F9_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
12F9_VH_CDR3	GATYTMDY	243
12F9 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPIT**FGQGTKVEIKRT	131
12F9_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
12F9_VL_CDR2	LGSNRAS	60
12F9_VL_CDR3	MQALQTPIT	244

11) variantes de desaminación

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 VH_D52dE	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKT**E**GGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	248
16D5 VH_D52dQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKT**Q**GGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	249
CD3_VH N100A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFG**A**SYVSWFAYWGQGTLVTVSS	250

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
CD3_VH S100aA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGN**A**YVSWFAY WGQGTLVTVSS	251
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-N100A]-Fcpomo_PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGG SGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY AMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASY VSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	252
16D5-Fcagujero-PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	253

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
CD3-CLC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	254
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-S100aA]-Fcpomo_PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGG SGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNAYVS WFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	255
CD3_VLCH1	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	259

12) TCB basados en Mov19 de realizaciones ejemplares (CDR subrayadas)

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11646 Mov19	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFT**GYFMN**WVK QSHGKSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQNFKD**KATLTVDKSSN TAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVT	136

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
VH-CH1-Fcagujero PG/LALA	VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
pETR11647 Mov19 VH-CH1-CD3 VH-CL-Fcpomo PG/LALA	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFT**GYFMN**WVK QSHGKSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQNFKD**KATLTVDKSSN TAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS**GFTFNTYAMN**WV RQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADSVKD**RFTISRD DSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR**HGNFGNSYVSWFA Y**WGQGTLVTVSAASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	137
pETR11644 Mov19 LC	DIELTQSPASLAVSLGQRAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**W YHQKPGQQPKLLIY**RASNLEA**GVPTRFSGSGSKTDFTLN IHPVEEEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	138

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
Hu IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	245

13)TCB de FolR1 con moléculas de unión de afinidad intermedia (CDR de acuerdo con Kabat, subrayadas):

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 variante W96Y/D52E VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDY WGQGTLVTVSS	274
W96Y/D52E_VH CDR1	NAWMS	16
W96Y/D52E_VH CDR2	RIKSKTEGGTTDYAAPVKG	275
W96Y/D52E_VH CDR3	PYEWSWYDY	315
16D5 variante W96Y/D52E VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W96Y/D52E_CD3-VHCH1_Fc-pomo_PGLALA pETR14945	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	276
W96Y/D52E_Fc-agujero_PGLALA_HYRF pETR14946	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	277
14B1 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**GDYRYRYFDY**WGQGTLVTVSS	278

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQ KPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTIT GAQAEDEADYYC**NSRESPPTGLVV**FGGGTKLTVL	279
14B1[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14976	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYRYRYFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD GGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	280
14B1[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14977	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYRYRYFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	281

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1 LC [KK] Lambda constante pETR14979	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRESPPTGLVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSKKLQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	282
9C7 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMGI**INPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GDWSYYMDY**WGQGTLVTVSS	283
9C7 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQARQTPT**FGQGTKVEIK	284
9C7[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14974	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDWSYYMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	285

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14975	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDWSYYMDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	286
9C7 LC [RK] pETR14980	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYL DWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	316

14) Secuencias de antígeno

Antígeno	Secuencia	SEC ID Nº
hu FolR1	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQT**RIAWARTELLNVCMN AKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHK DVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLG PWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYT CKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVL CNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVA RFYAAAM**SGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS	139

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
huFolR1 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM**VD**EQLYFQG**GSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIFEAQKIEWHE**	140
Fcagujero	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	141
mu FolR1	MAHLMTVQLLLLVMWMAECAQSRA**TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNSCCSTNTSQEAHKDISYLYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDVPLCKEDCQQWWEDCQSSFTCKSNWHKGWNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTSAALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAEAM**SGAGLHGTWPLLCSLSLVLLWVIS	142

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
mu FolR1 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNS CCSTNTSQEAHKDISYLYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQD TCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDVPLCKEDCQQ WWEDCQSSFTCKSNWHKGWNWSSGHNECPVGASCHP FTFYFPTSAALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQMWFDP AQGNPNEEVARFYAEAM**VD**EQLYFQG**GSPKSADKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIFEAQKIEW HE**	143
cy FolR1	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRTARARTELLNVCMN AKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQEAHKD VSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPW IQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKS NWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEI WTYSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA AAMSGAGPWAAWPLLLSLALTLLWLLS	144
cy FolR1 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**RTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWK KNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKR HFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKE DCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGA ACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSRGSGRCIQM WFDPAQGNPNEEVARFYAAAM**VD**EQLYFQG**GSPKSADK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGG**LNDIFEA QKIEWHE**	145

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
hu FolR2	MVWKWMPLLLLLVCVATMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHK TKPGPEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLYN FNWDHCGKMEPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVN QSWRKERFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHR GWDWTSGVNKCPAGALCRTFESYFPTPAALCEGLWSHS YKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVARFYAAAMH VNAGEMLHGTGGLLLSLALMLQLWLLG	146
hu FolR2 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**TMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSP WKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPAC KRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVNQSWRKERFLDVPLC KEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHRGWDWTSGVNKCPA GALCRTFESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSRGSGRCI QMWFDSAQGNPNEEVARFYAAAMHV**VD**EQLYFQG**GSP KSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIF EAQKIEWHE**	147
hu FolR3	MAWQMMQLLLLALVTAAGSAQPR**SARARTDLLNVCMNA KHHKTQPSPEDELYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDT SRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWI RQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSN WHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLW SHSFKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVAKFYAA AMNAGAPSRGIIDS**	148

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
hu FolR3 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**SARARTDLLNVCMNAKHHKTQPSPEDELYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWIRQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSFKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVAKFYAAAMNAGAPSRGIIDS**VD**<u>**EQLYFQG**</u>GSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIFEAQKIEWHE**	149
hu CD3	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWG**QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD**VMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI	150

15) Secuencias de nucleótidos de realizaciones ejemplares

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16A3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCACGCAACTACTACGCTGGTGTTACTCCGTTCGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	151

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
15A1	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACATCGGTGTTGTTACTTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	152
18D3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACACTGGTGGTTCTTCTGCTTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	153
19E5	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGNTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGAATGGCGTCGTTACACTTCTTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	154

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
19A4	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGGTTGGATCCGTTGGGAACATTTCGACTAT TGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	155
15H7	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACCTGTTCTCTACTTCTTTCGACTATTG GGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	156
15B6	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAGGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACATCGGTATCGTTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	157

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	158
15E12	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCNGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACCGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTACTTCGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	159
21D1	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACGTTGGTGTTTCTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	160

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16F12	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGNTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCNTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTTCACTGTTCTGCGTGTTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	161
21A5	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGGCTTGGTTCGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	162
21G8	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACCGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCTTGGGAATGGGCTTACTTCGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	163

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
19H3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCACTGGTTGGTCTCGTTGGGGTTACATGGACTATT GGGGCCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	164
20G6	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGAATGGATCCGTTACTACCATTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	165
20H7	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGTTGGTTGGTACCGTTGGGGTTACATGGACTAT TGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	166

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
11F8_VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCCGGAGGCACATTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGG GTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGAT GGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTAACCATTACTGCA GACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGT GCGAGAGCTGTTTTCTACCGTGCTTGGTACTCTTTCG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCT CA	167
11F8_VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTG CCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACG TTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAACT TATTACTGCCAACAGTATACCAGCCCACCACCAACGT TTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG	168
36F2_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCATG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTGGG GTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	169

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATACCAACGAACATTATTATACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	170
5D9_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCACGCTCTTACATCGACATGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	177
5D9_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGATAACTGGAGCCCAACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	178

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
6B6_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTACGTTGACATGGACTATTGGGGTCAAGGC ACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	179
6B6_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACCTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC AGTGTATTACTGTCAGCAGGATATTTGGAGCCCAACG TTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	180
14E4_VH	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGC GAAAGACTCTTCTTACGTTGAATGGTACGCTTTCGAC TACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	181

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
14E4_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCCAACCAGCAGCCCAATTACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	182
Cadena pesada de CD3 (VHCH1)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGC	183

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
Cadena pesada de CD3 cruzada (VHC□)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCC TCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGA AAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACA ATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATC TGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTC CCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGATTAT GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGT	184
Cebador GAB7734 de mutagénesis N95Q	GCAGGCAAGCATTATGCAGCGGACTTTTGGTCAAGG	185
Cebador GAB7735 de mutagénesis N95S	CAGGCAAGCATTATGAGCCGGACTTTTGGTCAAGG	186

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
Cebador GAB7736 de mutagénesis T97A	CATTATGAACCGGGCTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC	187
Cebador GAB7737 de mutagénesis T97N	CATTATGAACCGGAATTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC	188

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
VHCH1[16D5]_VHCH1[CD3]_Fcpomo_PGLALA pCON999 (TCB invertido con 16D5 2+1: pCON999 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCT GGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGT CCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCA AGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCAC GGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCT ACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC GCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCA CCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCT CTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC TCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG TCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAA AGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC	189

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VHCH1[16D5]_Fagujero_PGLALA_HYRF pCON983	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTG GCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCGCTTCACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA	190

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
CD3_cadena ligera común pETR13197	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTCCTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	191

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
VHCH1[CD3]_VHCH1[16D5]_Fcpomo_PGLALA pETR13932 (TCB clásico con 16D5; 2+1: pETR13932+ pCON983+ pETR13197)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCATCTGCTAGCACAAAGGGCCCT AGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACA AGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAA CAGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCC CTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGA GCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGG ATCCGAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCT GGTAAAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGC GGCTTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAG CTGGGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGT GGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCA CCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTAC CATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTG CAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCT ACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACG ATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTA GCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGG CACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCC GCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTG CCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTA ATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAA GAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGG	192

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
VHCH1[CD3]_Fcpomo_PGLALA pETR13719 (formato de IgG de 16D5, 1+1: pETR13719 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAA	193

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
Fc_agujero_PGLALA_HYRF pETR10755 (16D5 cabeza a cola, 1+1: pCON999 + pETR10755 + pETR13197)	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCG CTTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A	194

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VLCH1[CD3] pETR12940	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGT GTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAG TTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAA CTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAG GACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGC ACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGA AAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAA GATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGC AACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTTCCGTG TTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAG GCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATT TTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCT GCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT	198

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 invertido 2+1 con N100A en CDR H3 pETR14096 (pETR14096 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCT GGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGT CCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCA AGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCAC GGCAACTTCGGCGCCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCC TACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC GCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCA CCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCT CTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC TCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG TCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAA AGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC	200

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 invertido 2+1 con S100aA en CDR H3 pETR14097 (pETR14097 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCT GGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGT CCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCA AGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCAC GGCAACTTCGGCAACGCCTATGTGTCTTGGTTTGCCT ACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC GCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCA CCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCT CTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC TCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG TCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAA AGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC	201

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena ligera de CD3 fusionada a CH1; Fc_PGLALA; pETR13862 (anticuerpo Kappa-lambda con cadena ligera común de CD3 fusionada a CH1 + Fc_PGLALA. VH fusionadas a cadena constante kappa o lambda pETR13859 + pETR13860 + pETR13862)	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGT GTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAG TTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAA CTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAG GACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGC ACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGA AAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAA GATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGC AACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACC TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA	202

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5 VH fusionado a cadena kappa constante; pETR13859	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCT TCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTC GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC GGCAACAGCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTC CAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGAC CCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA CGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCC CGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGC	203

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
CD3 VH fusionado a cadena lambda constante; pETR13860	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGATCCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCTCTCGGGACGACTCCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACTCC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCATCTGCTAGCCCCAAGGCTGCC CCCAGCGTGACCCTGTTTCCCCCCAGCAGCGAGGAA CTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATC AGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG AGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGT ACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAG CAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTG ACCCACGAGGGCAGCACC GTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	204

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
VHCH1[36F2]_VHCL[CD3]_Fc pomo_PG LALA pCON1056	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCATG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTGGG GTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCAC AAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAG CAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCT GCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCG TGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACTCTCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCA GCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGG AGCCCAAG AGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGG ATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACT GGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAA CTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAAT GGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACG CCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAAC AGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGC ACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCT CCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGC TGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGA ACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAA AGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGA ATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTA CTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGAT TATGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG	246

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2-Fc agujero PGLALA pCON1050	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCATG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTGGG GTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCAC CAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCA GCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACC GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	247

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2 LC pCON1062	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCnA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATACCAACGAACATTA TTATACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCANGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	97
CD3 VLCH1 pETR12940	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGT GTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAG TTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAA CTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAG GACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGC ACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGA AAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAA GATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGC AACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTTCCGTG TTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAG GCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATT TTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCT GCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT	198

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
K53A nt	CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTG TCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGT TCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGG ACTGATCGGCGGCACCAACGCCAGAGCCCCTGGCA CCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAA AGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGTGCAGCCTGAAG ATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCA ACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTCCTA	205
S93A nt	CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTG TCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGT TCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGG ACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGCAC CCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAA GGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGTGCAGCCTGAAGA TGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACGCCAA CCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGT CCTA	206

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
S35H nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGCACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACC ACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTTGGTAC GACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCC TCTGCTAGC	207

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
G49S nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGTCCCGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACCA CCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTTGGTACG ACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCCT CTGCTAGC	208
R50S nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGATCTATCAAGAGCAAGACCGACGGCGGCACCA CCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTTGGTACG ACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCCT CT GCTAGC	209
W96Y nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACC ACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGGTAC GACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCA TCT GCTAGC	210

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W98Y nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACC ACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTACTCTTGGTAC GACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCA TCT GCTAGC	211

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
90D7 nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACACTATCGTTGTTTCTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTA GC	212
90C1 nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTTCATCGGTTCTGTTGCTATGGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTA GC	213

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
5E8 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTCTGACTTACTCTATGGACTATTGGGGTCAA GGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	214
5E8 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGG TGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTT CCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACT ATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCC CTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTT CCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCG GCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGC AGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCACT GCAGATTCCAAACACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC GAAATTAAACGTACG	215
12A4 VH nt	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGC GAAATACGCTTACGCTCTGGACTACTGGGGCCAAGG AACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGC	216

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
12A4 VL nt	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCATGGCAGCAGCAGCACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAACGTACG	217
7A3 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTTCTCTGCTGGTCGTCTGATGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	218
7A3 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCACTGCAGACCCCACCAATTACCTTTGGTCAAGGCACCAAGGTCGAAATTAAACGTACG	219

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
6E10 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGACTACAACGCTTTCGACTATTGGGGTCAC GGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	220
6E10 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGG TGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTT CCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACT ATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCC CTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTT CCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCG GCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGC AGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCATG GCATAGCCCAACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTCGA AATTAAACGTACG	221
12F9 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGCTACTTACACTATGGACTATTGGGGTCAA GGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	222

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
12F9 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCACTGCAGACCCCAATTACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTCGAAATTAAACGTACG	223
Nombre	**Secuencia**	**SEC ID Nº**

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11646 Mov19 VH-CH1-Fcagujero PG/LALA	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGT GAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGGC CAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTTCATGAACTG GGTCAAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGGAATGGAT CGGCAGAATCCACCCCTACGACGGCGACACCTTCTA CAACCAGAACTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGT GGACAAGAGCAGCAACACCGCCCACATGGAACTGCT GAGCCTGACCAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG CACCAGATACGACGGCAGCCGGGCCATGGATTATTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCCAGCGCTA GCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCA GCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTC TAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA	224

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11647 Mov19 VH-CH1-CD3 VH-CL-Fcpomo PG/LALA	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGT GAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGGC CAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTTCATGAACTG GGTCAAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGGAATGGAT CGGCAGAATCCACCCCTACGACGGCGACACCTTCTA CAACCAGAACTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGT GGACAAGAGCAGCAACACCGCCCACATGGAACTGCT GAGCCTGACCAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG CACCAGATACGACGGCAGCCGGGCCATGGATTATTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCCAGCGCTA GCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTG GGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTG ACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGC AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAG GTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTC CGGAGGCGGAGGATCCGAAGTGCAGCTGGTGGAAA GCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTAAGGGCTCTCTG AAGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAAC ACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGG CAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGAAGCAA GTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGT GAAGGACCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCC AGAGCATCCTGTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAAC CGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGTGCGGCACG GCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTA CTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACAGTGTCTGCTG CTAGCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCC ATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGT CGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCT AAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCC GGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCC AAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACA CTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGA CCCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTG CTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGC	225

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11644 Mov19 LC	GACATCGAGCTGACCCAGAGCCCTGCCTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGACAGAGAGCCATCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGTCCTTTGCCGGCACCTCTCTGATGCACTGGTATCACCAGAAGCCCGGCCAGCAGCCCAAGCTGCTGATCTACAGAGCCAGCAACCTGGAAGCCGGCGTGCCCACAAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCAAGACCGACTTCACCCTGAACATCCACCCCGTGGAAGAAGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAGAGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	226

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 VH_D52dE	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGAGGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	261

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 VH_D52dQ	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAA AACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTT CCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGT TCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGG TCGTATCAAGTCTAAAACTCAGGGTGGCACCACGGAT TACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCG CGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACT CTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACT ACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCC AGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	262
CD3_VH N100A	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGG TGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGT CCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTA CTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATG AACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCGCCAGCTATGTGT CTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGAC CGTGTCAAGC	263
CD3_VH S100aA	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGG TGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGT CCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTA CTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATG AACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACGCCTATGTGTC TTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACC GTGTCAAGC	264

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-N100A]-Fcpomo_PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAA AACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTT CCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGT TCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGG TCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGAT TACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCG CGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACT CTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACT ACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCC AGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCACAAA GGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCT CGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCT TGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACT TTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA GAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAG GATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAAC TGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCAT CAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCGCCAGCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGT GTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGC GGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCA CCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATAT CTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCG ATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT	265

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5-Fcagujero-PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	266

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
CD3-CLC	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTG TCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTT CTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTG GGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACT GATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCC TGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCC GCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAAGATGAG GCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGT GGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTCCTAG GTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCC CCCCAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCAC CCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC GTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTG AAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAG AGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCC TGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACA GCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGA AAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	267

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-S100aA]-Fcpomo_PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAA AACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTT CCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGT TCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGG TCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGAT TACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCG CGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACT CTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACT ACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCC AGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCACAAA GGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCT CGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCT TGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACT TTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA GAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAG GATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAAC TGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCAT CAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACGCCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGT GTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGC GGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCA CCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATAT CTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCG ATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT	268

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
	CCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCT GGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTG AAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA	

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 variante W96Y/D 52E VH	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGG GTGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGAGGGCGGCAC CACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGG TACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGT GTCATCT	287

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W96Y/D52E-_CD3-VHCH1_Fc-pomo_PGLALA pETR14945	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGG GTGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGAGGGCGGCAC CACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGG TACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGT GTCATCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCC TCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAA CAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGC CCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCT GCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCC TAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAG GGTCCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTG GAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATC TCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCC CTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGA AGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGAC AGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGA CAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGC GGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGT TTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTG TCAAGCGCT AGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACC CAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCTC TGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC TCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG TCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAA AGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATG	288

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W96Y/D52E_Fc-agujero_PGLALA_HYRF pETR14946	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGG GTGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGAGGGCGGCAC CACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGG TACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGT GTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCA CAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGTTCT GGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCC TTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	289

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1 VH	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCGTTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA GT	290
14B1 VL	TCTTCTGAACTGACTCAAGATCCAGCTGTTAGCGTG GCTCTGGGTCAGACTGTACGTATCACCTGCCAAGGC GATTCTCTGCGCTCCTACTACGCAAGCTGGTACCAG CAGAAACCGGGTCAGGCCCCAGTTCTGGTGATTTAC GGCAAAAACAACCGTCCGTCTGGGATCCCGGACCG TTTCTCCGGCAGCTCTTCCGGTAACACGGCGAGCCT CACCATCACTGGCGCTCAAGCAGAAGACGAGGCCG ACTATTACTGTAACTCTCGGGAAAGCCCACCAACCG GCCTGGTTGTCTTCGGTGGCGGTACCAAGCTGACC GTCCTA	291

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14976	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCGTTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA GTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGG CCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACTGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGC CCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCTCTGACCT CCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCT CCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGC CCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACG AGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACGGTGGCGGA GGTTCCGGAGGCGGAGGATCCCAGGCTGTCGTGAC CCAGGAACCCTCCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCA CCGTGACCCTGACCTGTGGATCTTCTACCGGCGCTG TGACCACCTCCAACTACGCCAATTGGGTGCAGGAAA AGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGC ACCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTC TCCGGTTCTCTGCTGGGCGGCAAGGCTGCCCTGAC TCTGTCTGGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGT ACTACTGCGCCCTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGT TCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGTCCAGC GCTTCCACCAAGGGACCCAGTGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCTCCAAGTCTACATCCGGTGGCACAGCTGCC CTGGGATGTCTCGTGAAGGACTACTTTCCTGAGCCT GTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAG CGGAGTGCACACATTCCCTGCAGTGCTGCAGAGCA GCGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTCGTGACCGTG CCTTCCTCTAGCCTGGGAACACAGACATATATCTGTA ATGTGAATCATAAGCCCAGTAATACCAAAGTGGATAA GAAAGTGGAACCTAAGAGCTGCGATAAGACCCACAC CTGTCCCCCCTGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGTGG CCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTG	292

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14977	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCGTTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA GTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGC CGCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCG AGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTG ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA GAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCAC CGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACGAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT CTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	293

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1 LC [KK] Lambda constante pETR14979	TCTTCTGAACTGACTCAAGATCCAGCTGTTAGCGTG GCTCTGGGTCAGACTGTACGTATCACCTGCCAAGGC GATTCTCTGCGCTCCTACTACGCAAGCTGGTACCAG CAGAAACCGGGTCAGGCCCCAGTTCTGGTGATTTAC GGCAAAAACAACCGTCCGTCTGGGATCCCGGACCG TTTCTCCGGCAGCTCTTCCGGTAACACGGCGAGCCT CACCATCACTGGCGCTCAAGCAGAAGACGAGGCCG ACTATTACTGTAACTCTCGGGAAAGCCCACCAACCG GCCTGGTTGTCTTCGGTGGCGGTACCAAGCTGACC GTCCTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGAC CCTGTTCCCCCCCAGCAGCAAGAAACTGCAGGCCAA CAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTA CCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACA GCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACC CCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAG CAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGA GCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAG GGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGA GTGCAGC	294
9C7 VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAA AAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCA TCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGG TTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATG GGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTAC GCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCG TGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCC AGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGT GCACGCGGTGACTGGTCTTACTACATGGACTATTGG GGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	295

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7 VL	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGG TGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTT CCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACT ATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCC CTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTT CCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCC GGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAA GCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCA CGGCAGACCCCAACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC GAAATTAAA	296

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14974	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAA AAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCA TCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGG TTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATG GGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTAC GCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCG TGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCC AGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGT GCACGCGGTGACTGGTCTTACTACATGGACTATTGG GGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTCC AGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACTGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGAC CGTGTCCTGGAATTCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCT GTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACGAGAAGG TGGAACCCAAGTCCTGCGACGGTGGCGGAGGTTCC GGAGGCGGAGGATCCCAGGCTGTCGTGACCCAGGA ACCCTCCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACCGTGAC CCTGACCTGTGGATCTTCTACCGGCGCTGTGACCAC CTCCAACTACGCCAATTGGGTGCAGGAAAAGCCCGG CCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACA AGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCTCCGGTT CTCTGCTGGGCGGCAAGGCTGCCCTGACTCTGTCT GGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTACTG CGCCCTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTCGGCG GAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGTCCAGCGCTTCC ACCAAGGGACCCAGTGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CTCCAAGTCTACATCCGGTGGCACAGCTGCCCTGGG ATGTCTCGTGAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGAC AGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGAG TGCACACATTCCCTGCAGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTATAGCCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCC TCTAGCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTGA ATCATAAGCCCAGTAATACCAAAGTGGATAAGAAAGT GGAACCTAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCC CCCCTGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTA GCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCC TGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTG	297

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14975	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAA AAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCA TCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGG TTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATG GGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTAC GCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCG TGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCC AGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGT GCACGCGGTGACTGGTCTTACTACATGGACTATTGG GGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGG GCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTC TAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	298

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7 LC [RK] pETR14980	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGG TGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTT CCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACT ATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCC CTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTT CCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCC GGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAA GCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCA CGGCAGACCCCAACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC GAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC ATCTTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT	299

* * *

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención- Las divulgaciones de toda bibliografía de patente y científica citadas en el presente documento se incorporan expresamente en su integridad por referencia.

Fig. 1A

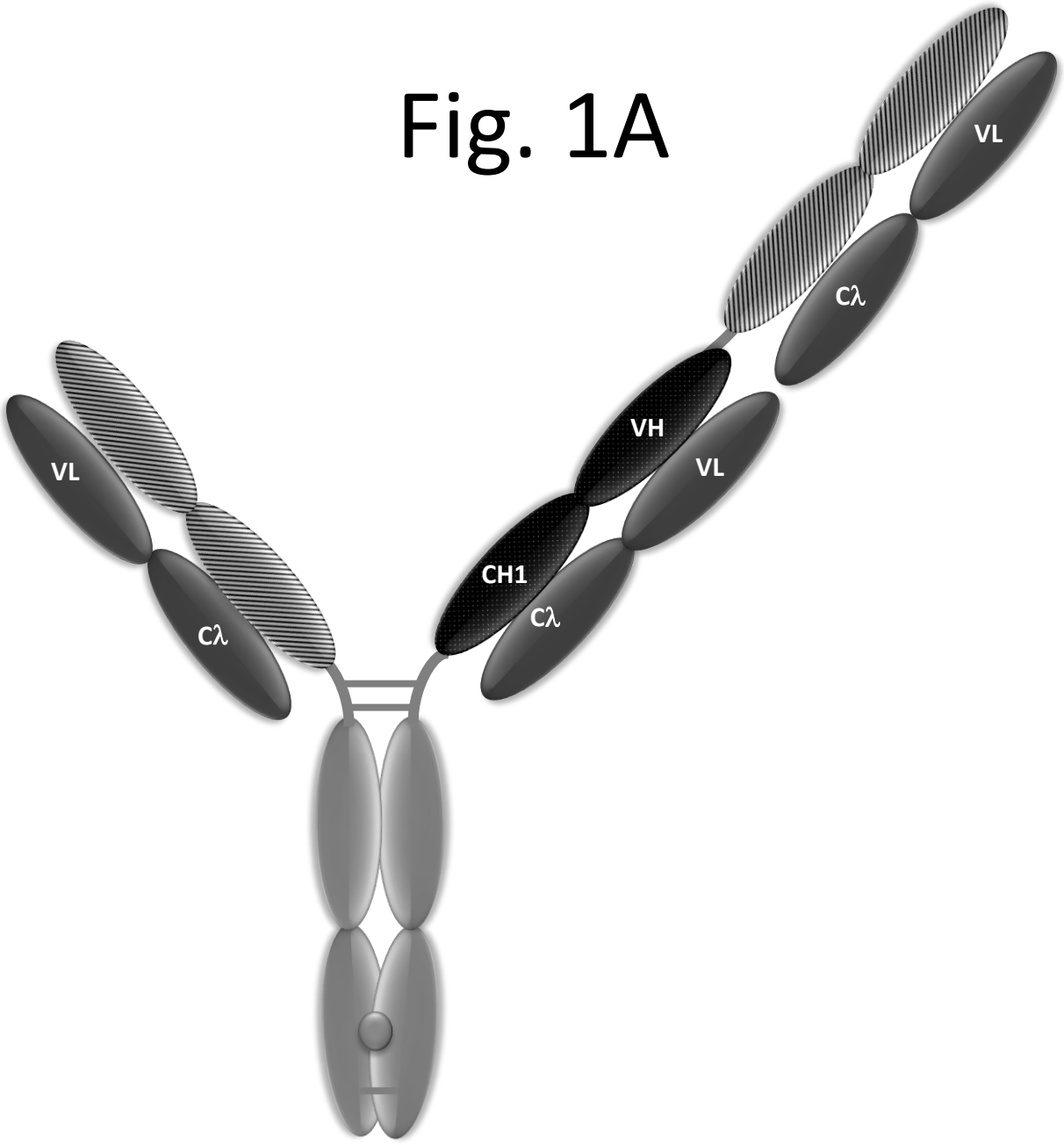


Fig. 1B

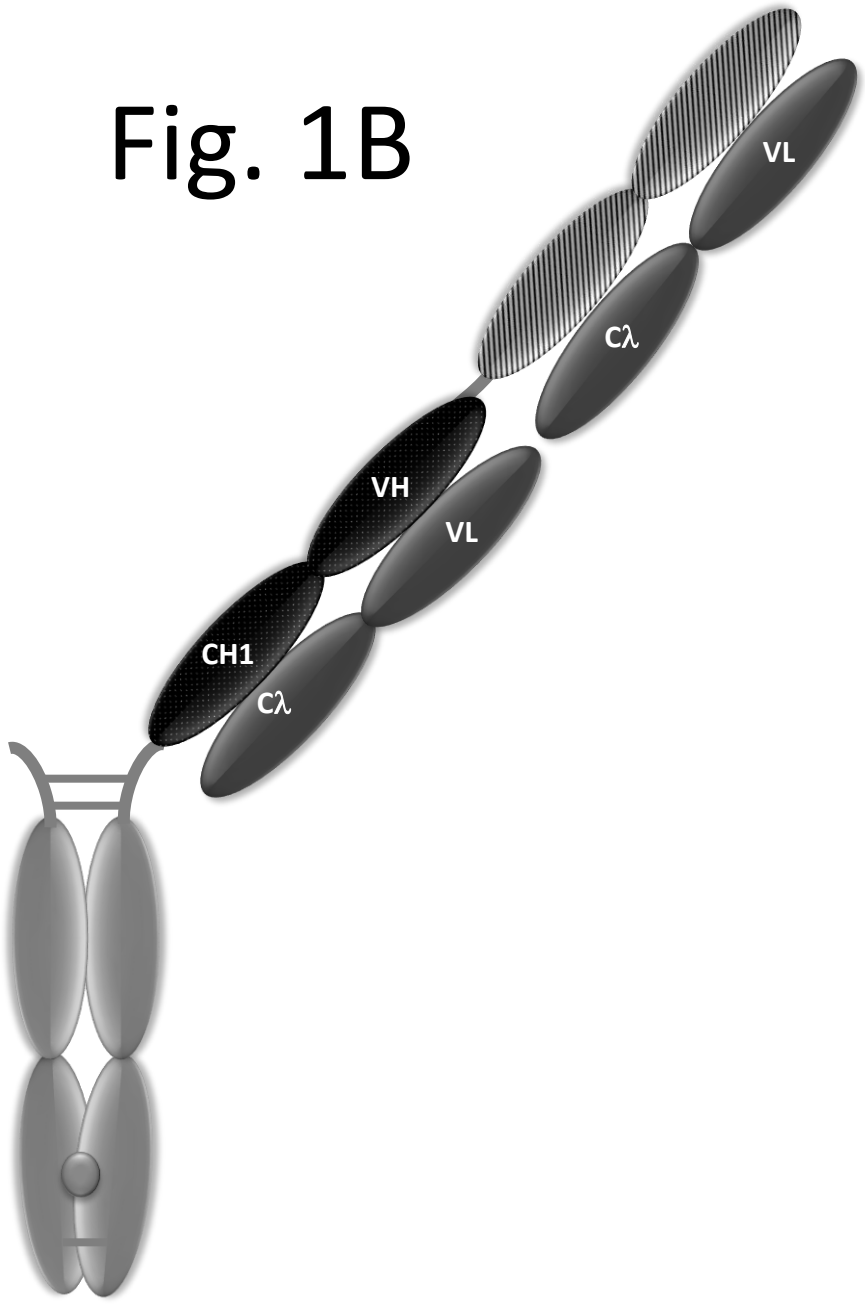


Fig. 1C

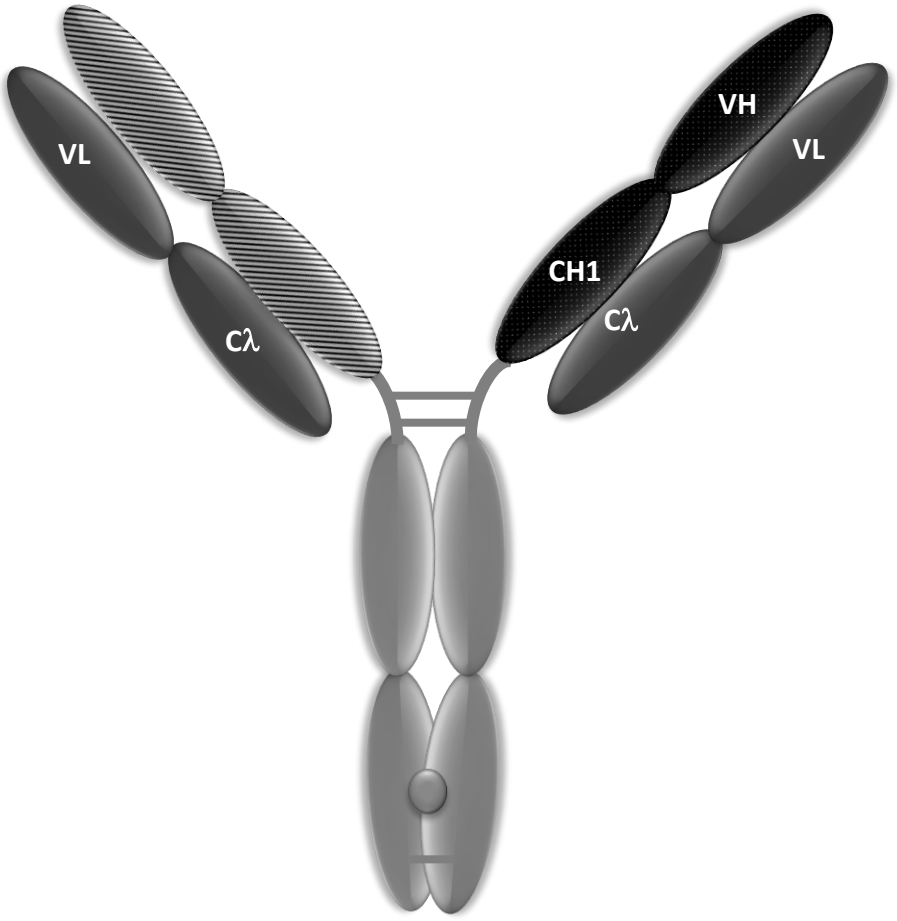


Fig. 1D

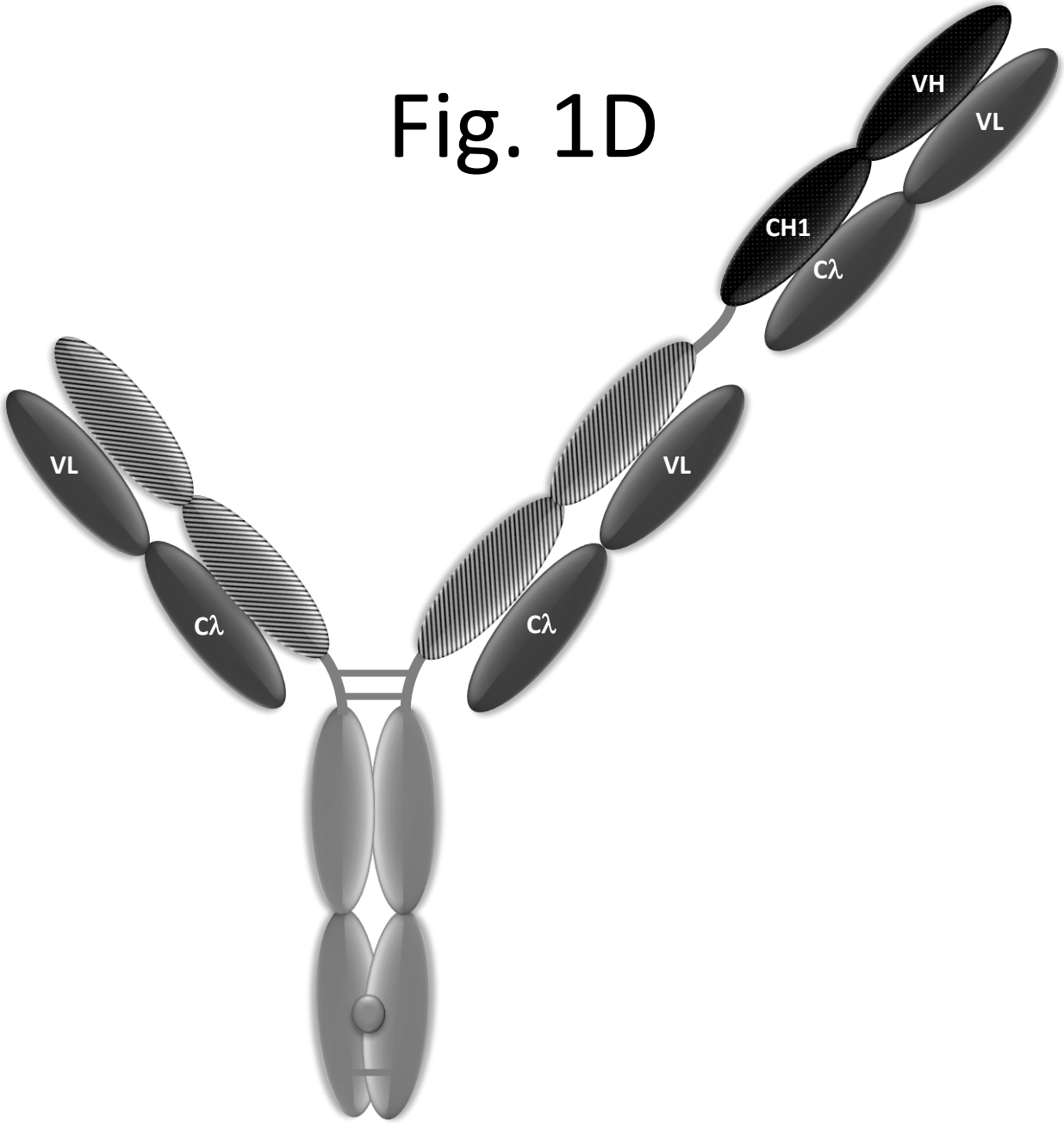


Fig. 1E

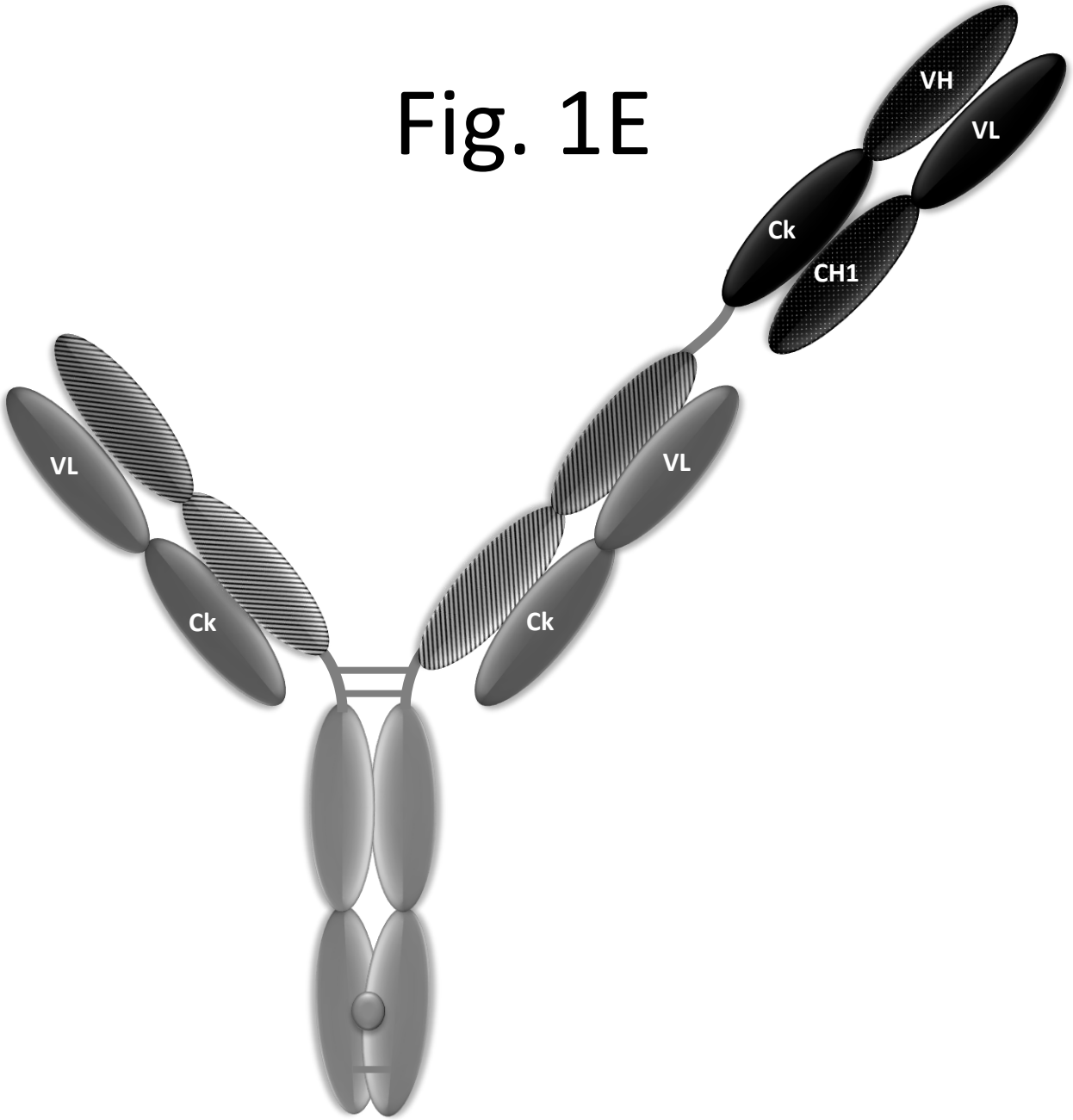


Fig. 1F

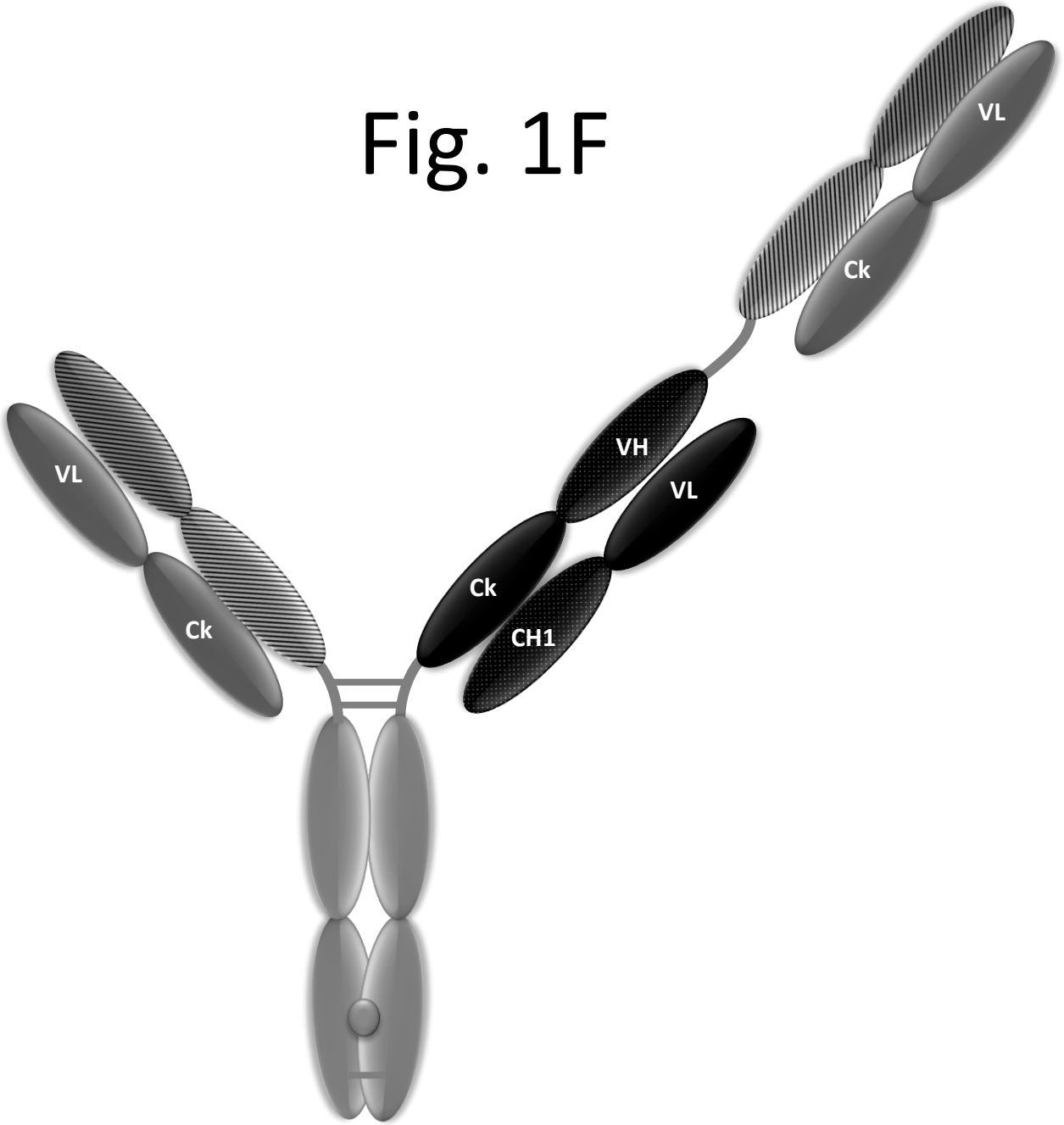


Fig. 1G

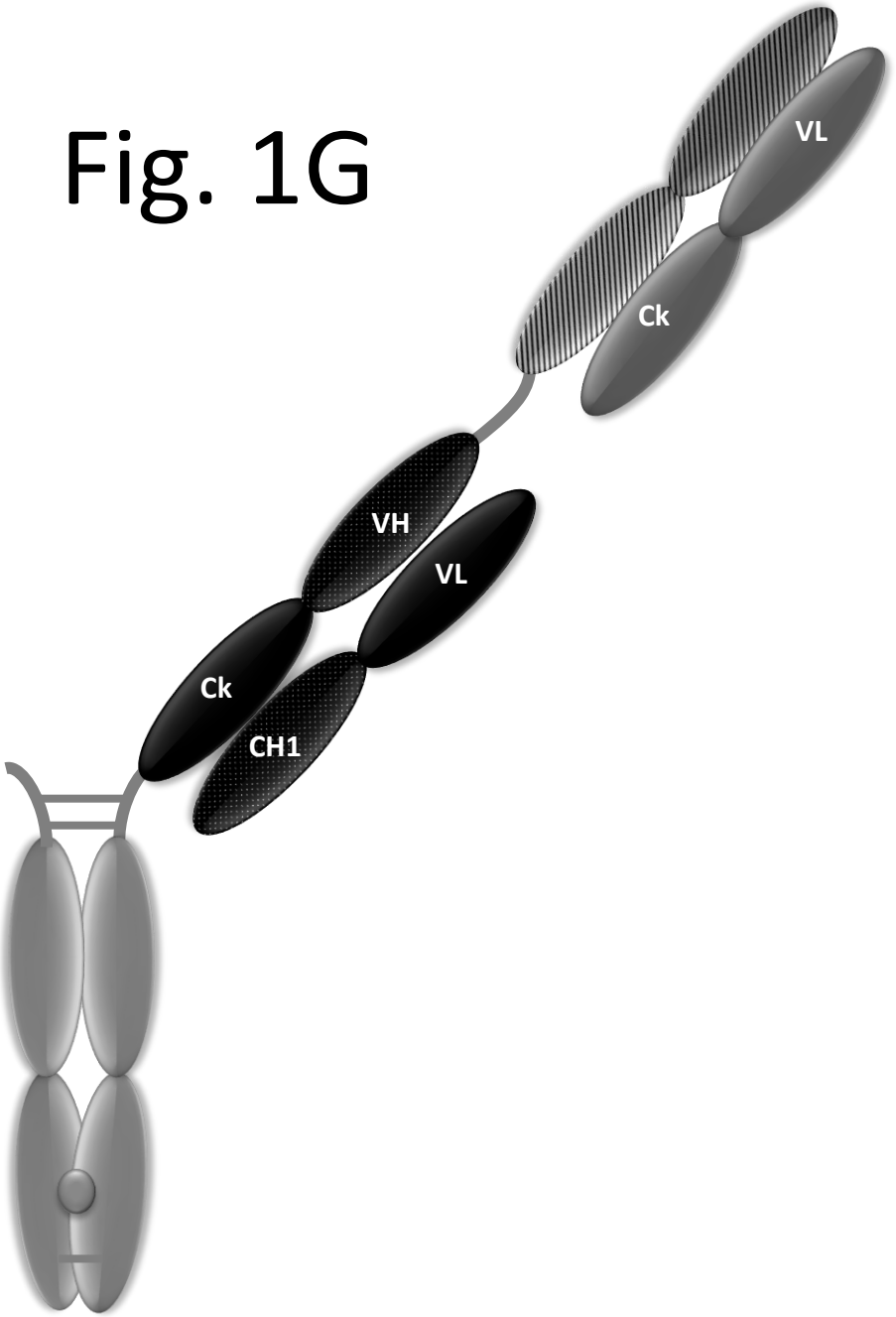


Fig. 1H

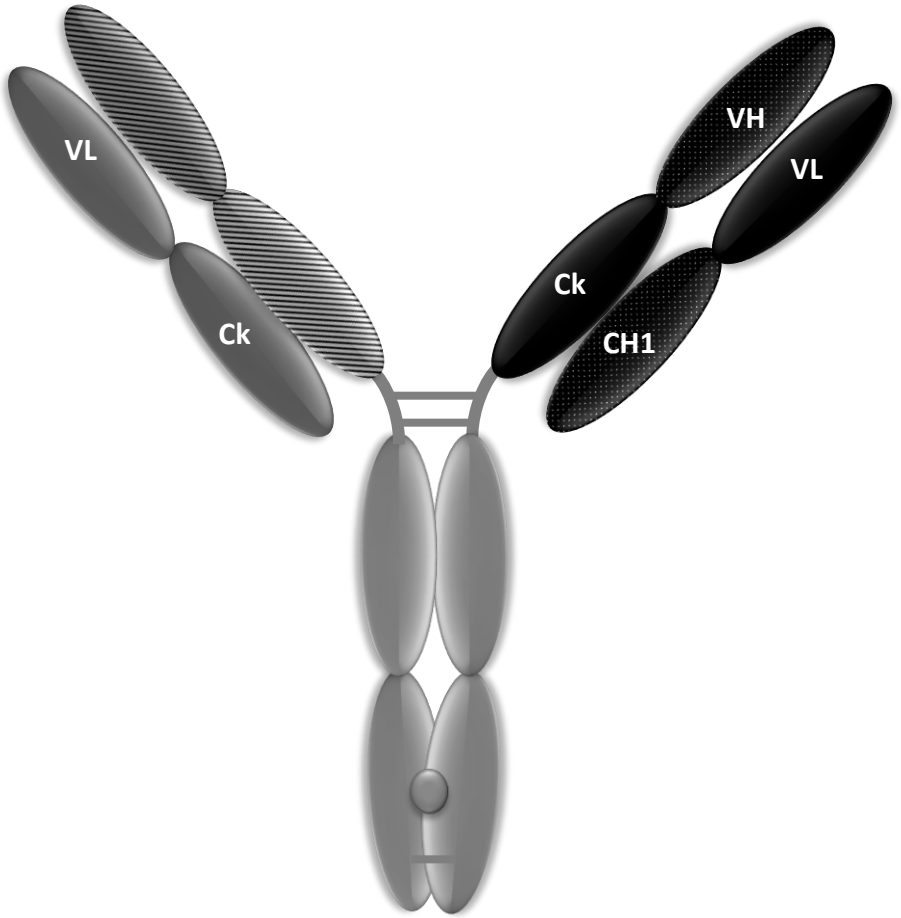


Fig. 1I

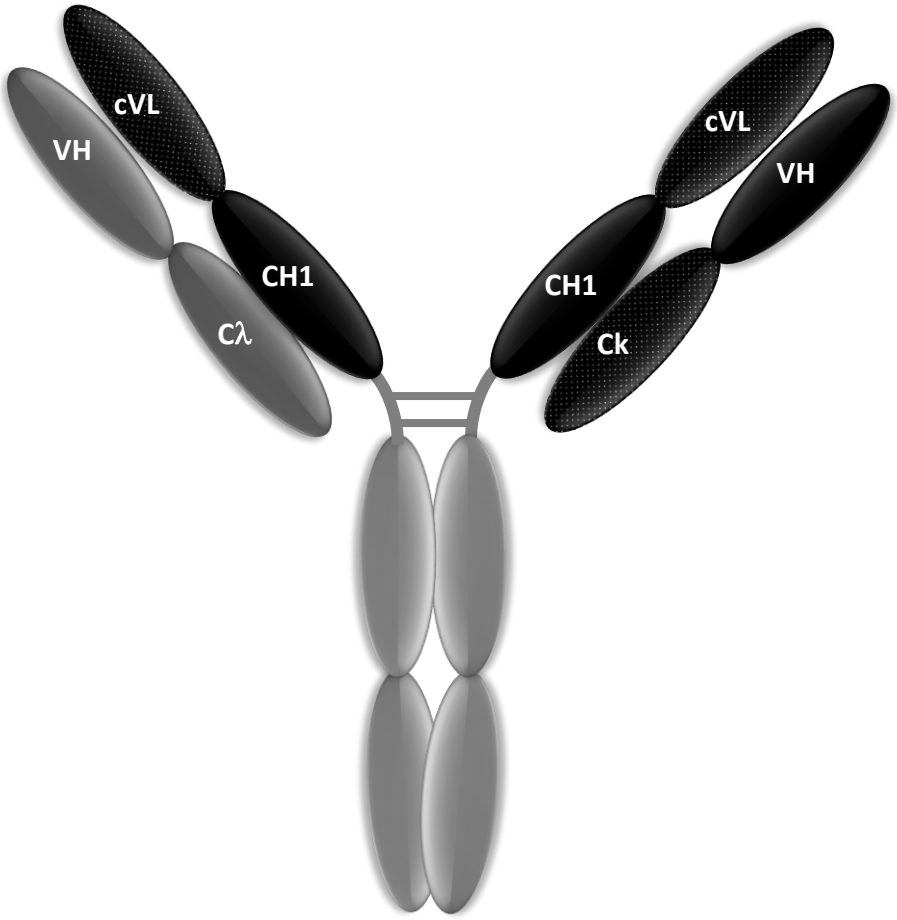


Fig. 2A **moléculas de unión a FolR1 CLCL**

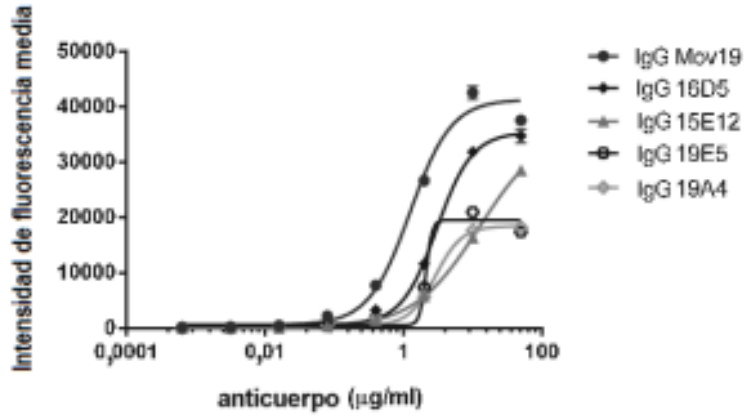


Fig. 2B **moléculas de unión a FolR1 CLCL**

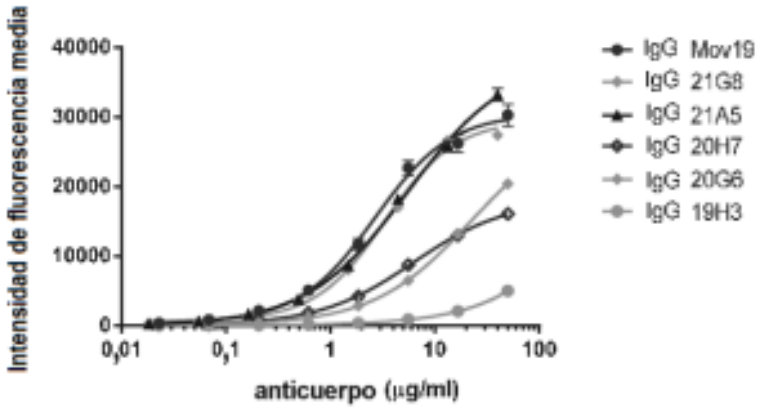


Fig. 2C **moléculas de unión a FolR1 Fab**

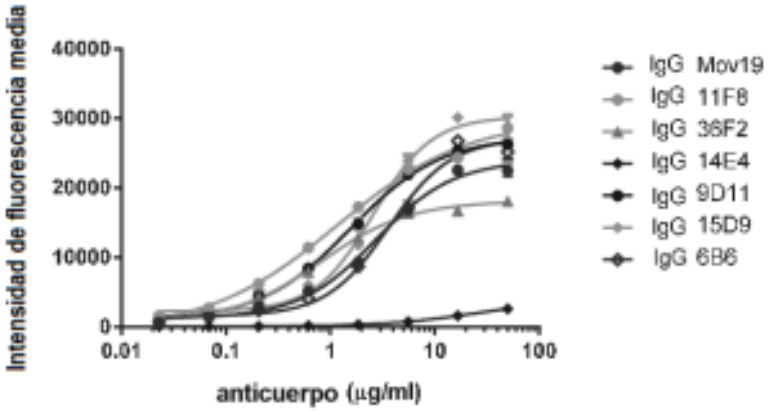


Fig. 3A

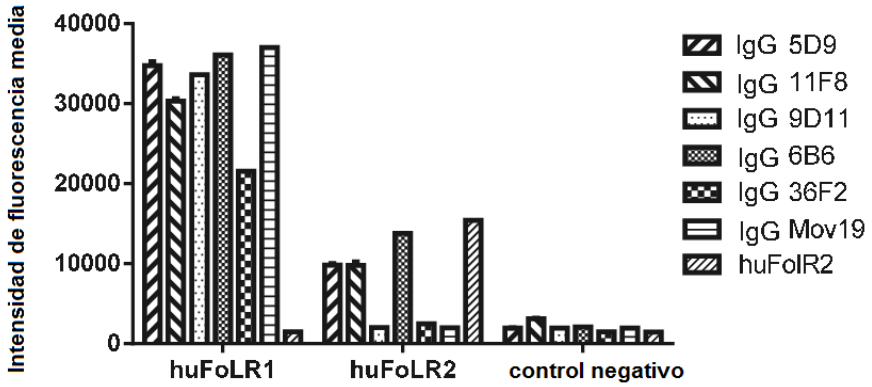

Intensidad de fluorescencia media
40000
30000
20000
10000
0
huFoLR1
huFoLR2
control negativo
IgG 5D9
IgG 11F8
IgG 9D11
IgG 6B6
IgG 36F2
IgG Mov19
huFolR2

Fig. 3B

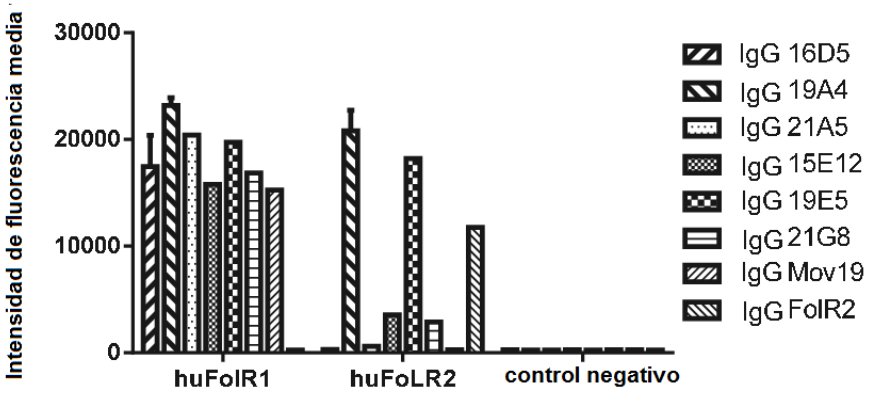

Intensidad de fluorescencia media
30000
20000
10000
0
huFolR1
huFoLR2
control negativo
IgG 16D5
IgG 19A4
IgG 21A5
IgG 15E12
IgG 19E5
IgG 21G8
IgG Mov19
IgG FolR2

Fig. 4A

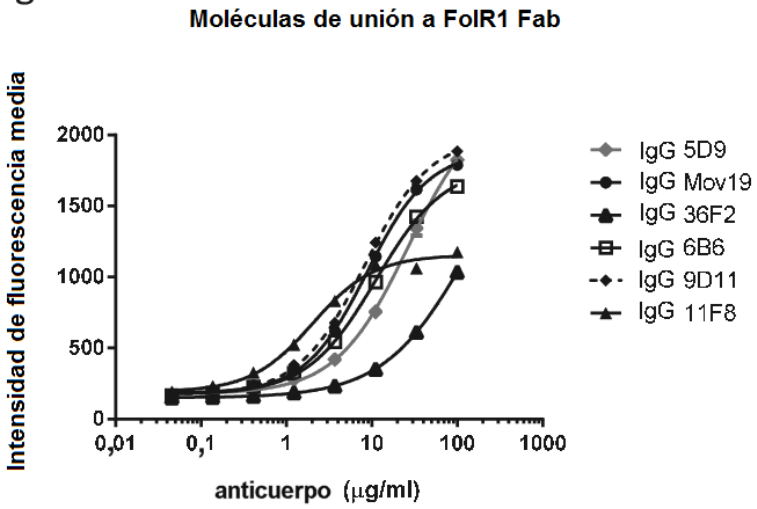

Moléculas de unión a FolR1 Fab
Intensidad de fluorescencia media
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
anticuerpo (µg/ml)
IgG 5D9
IgG Mov19
IgG 36F2
IgG 6B6
IgG 9D11
IgG 11F8

Fig. 4B

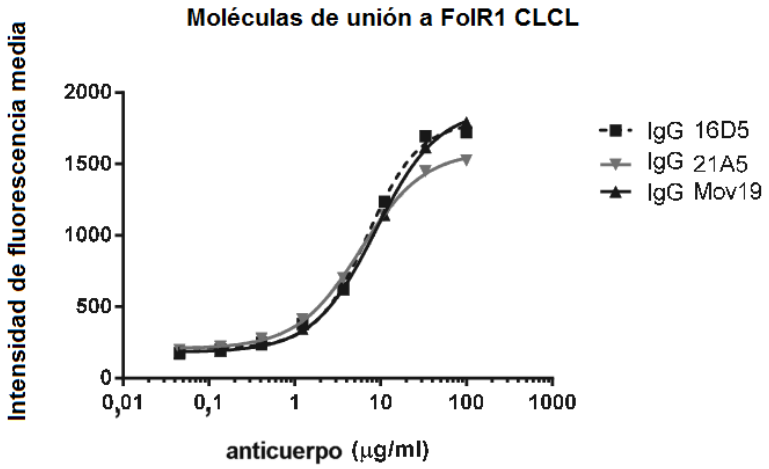

Moléculas de unión a FolR1 CLCL
Intensidad de fluorescencia media
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
anticuerpo (µg/ml)
IgG 16D5
IgG 21A5
IgG Mov19

Fig. 5

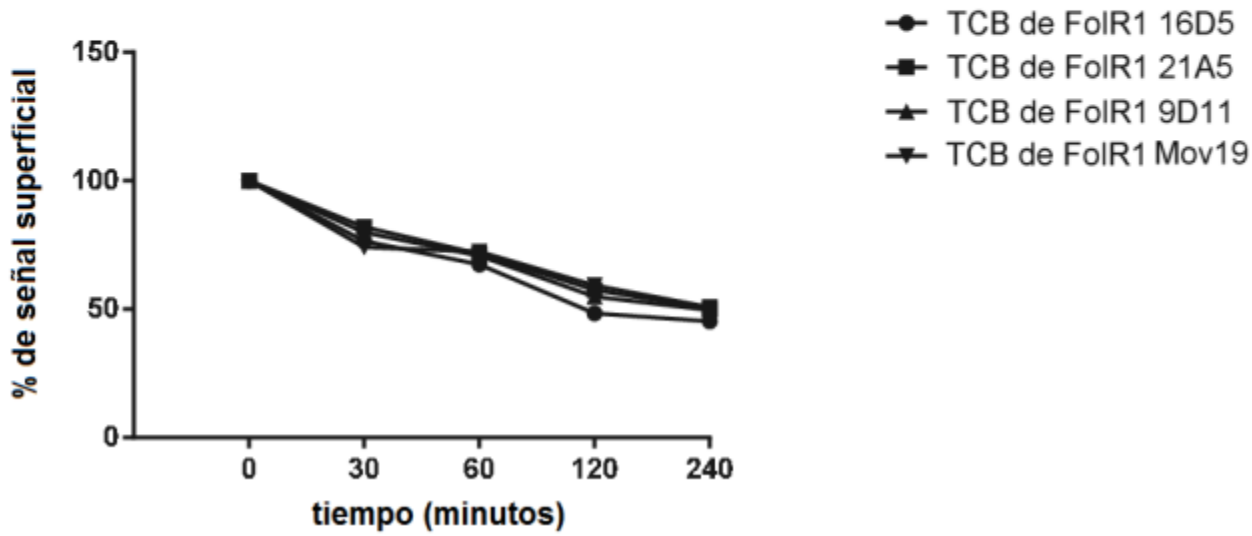

% de señal superficial
150
100
50
0
0
30
60
120
240
tiempo (minutos)
TCB de FolR1 16D5
TCB de FolR1 21A5
TCB de FolR1 9D11
TCB de FolR1 Mov19

Fig. 6A

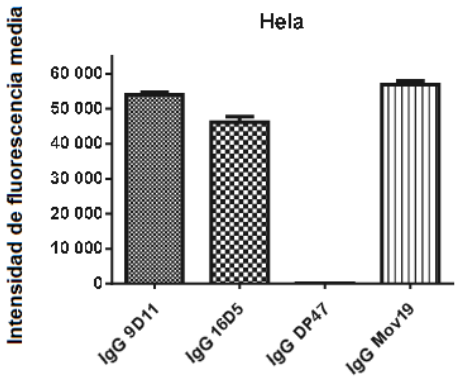


Fig. 6B

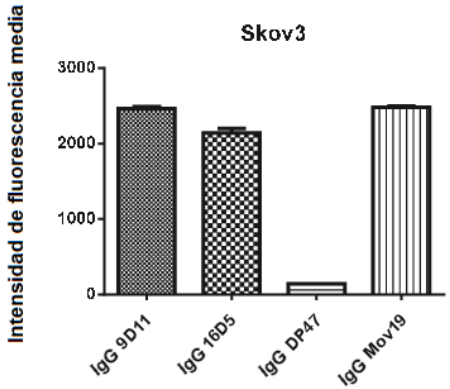


Fig. 6C

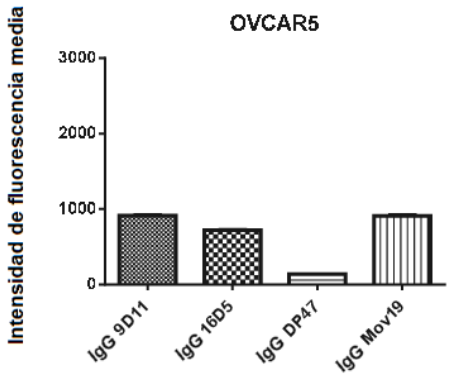


Fig. 6D

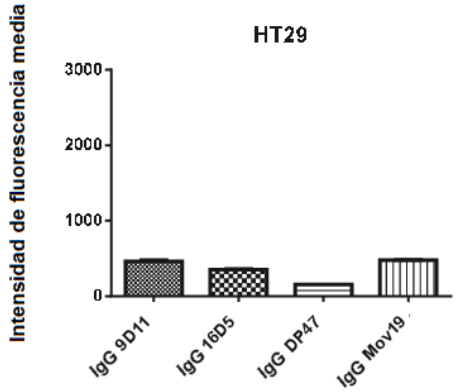


Fig. 6E

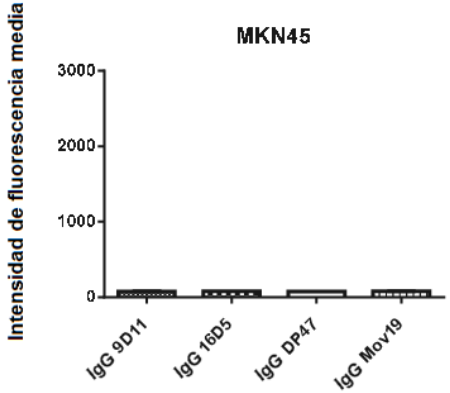


Fig. 7A

HT29

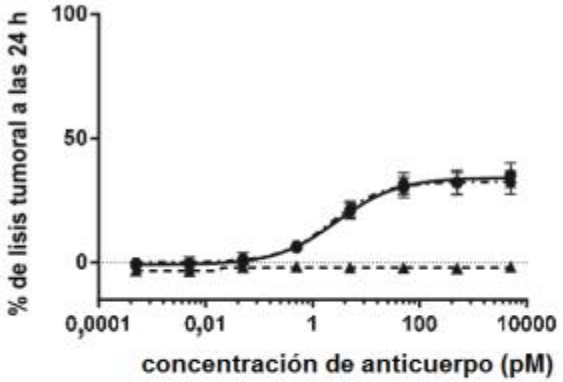


Fig. 7B

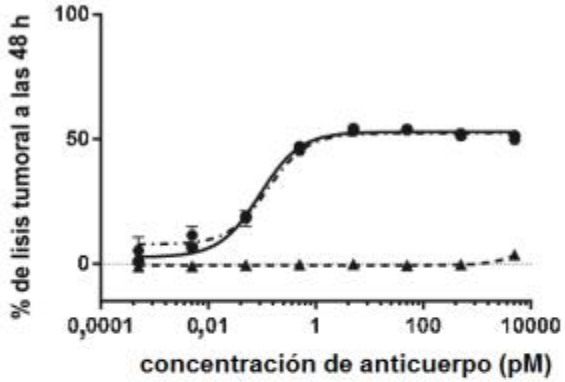


Fig. 7C

SKOV3

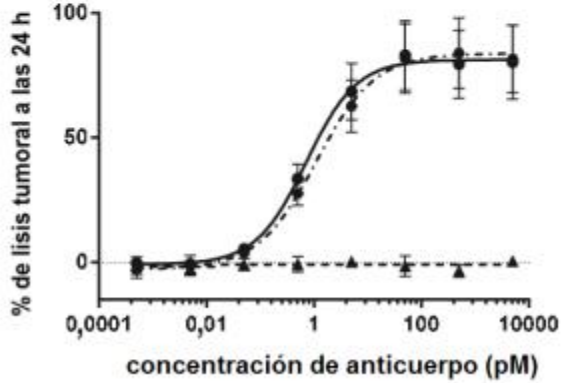
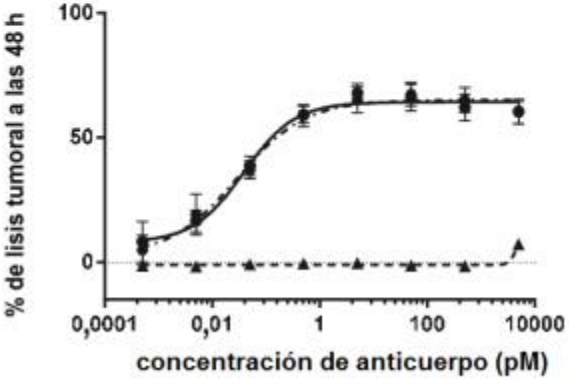


Fig. 7D



TCB de FolR1 16D5 TCB de FolR1 9D11 TCB de DP47

Fig. 7E

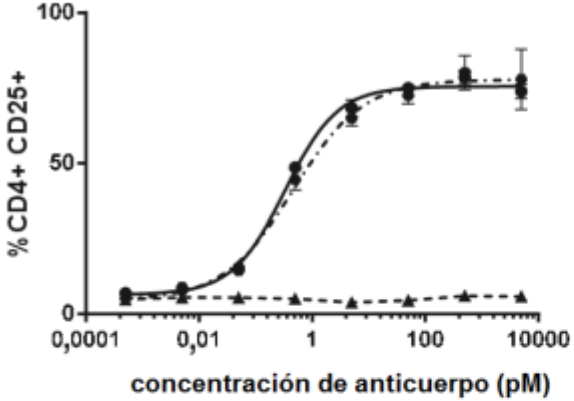


Fig. 7F

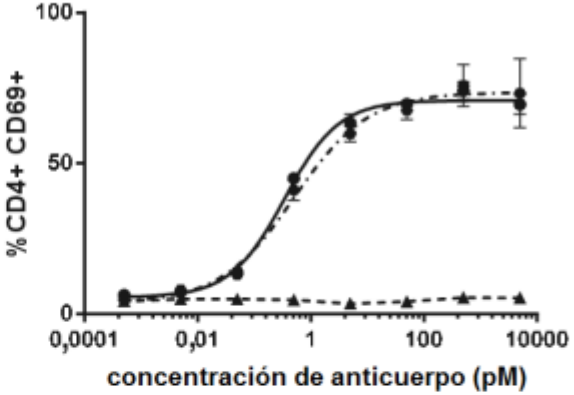


Fig. 7G

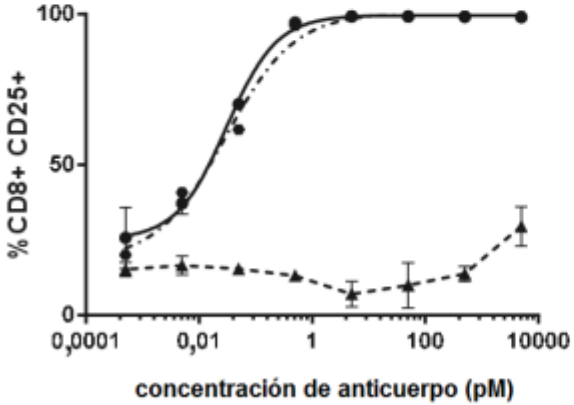
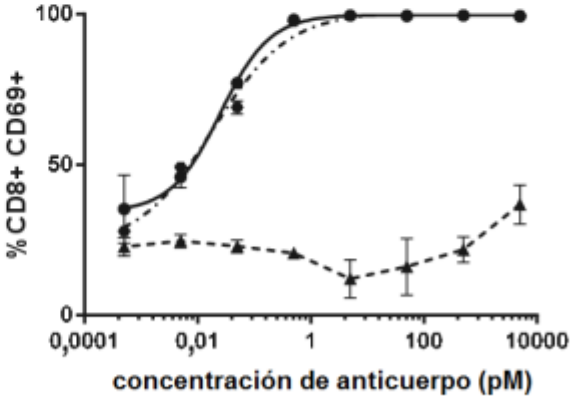


Fig. 7H



TCB de FolR1 16D5 — TCB de FolR1 9D11 — TCB de DP47

Fig. 7I

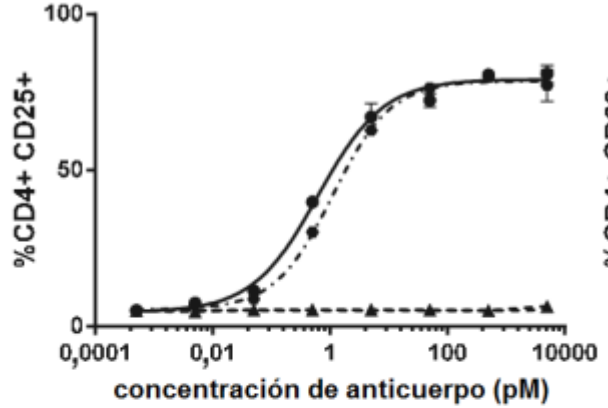


Fig. 7J

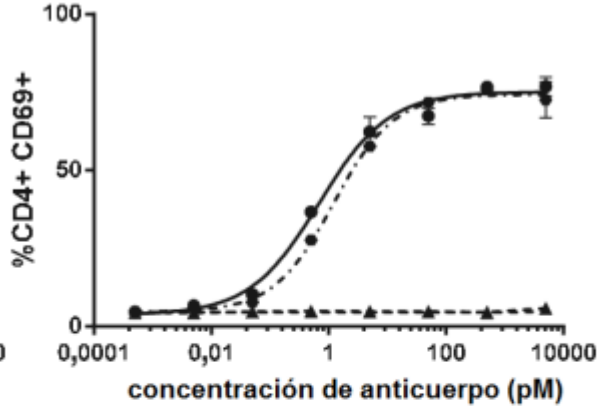


Fig. 7K

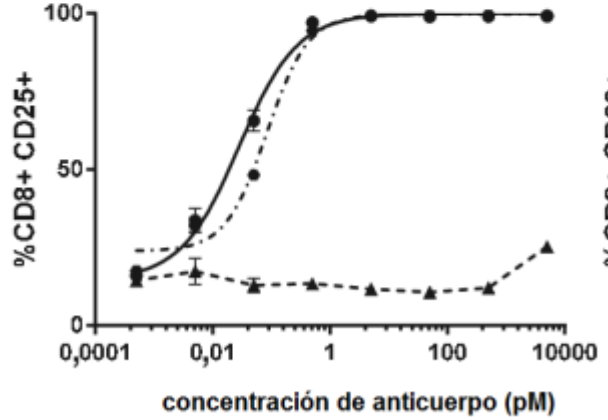
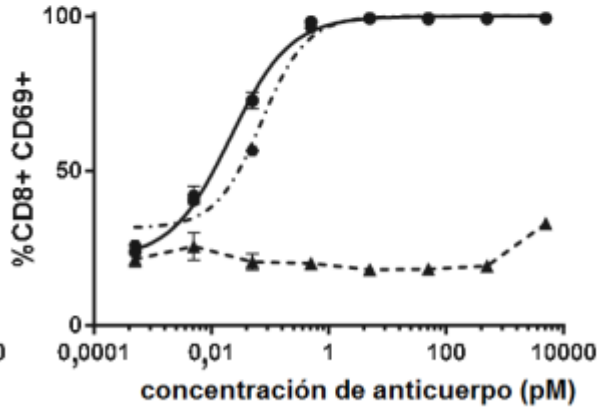


Fig. 7L



TCB de FolR1 16D5 TCB de FolR1 9D11 TCB de DP47

Fig. 8

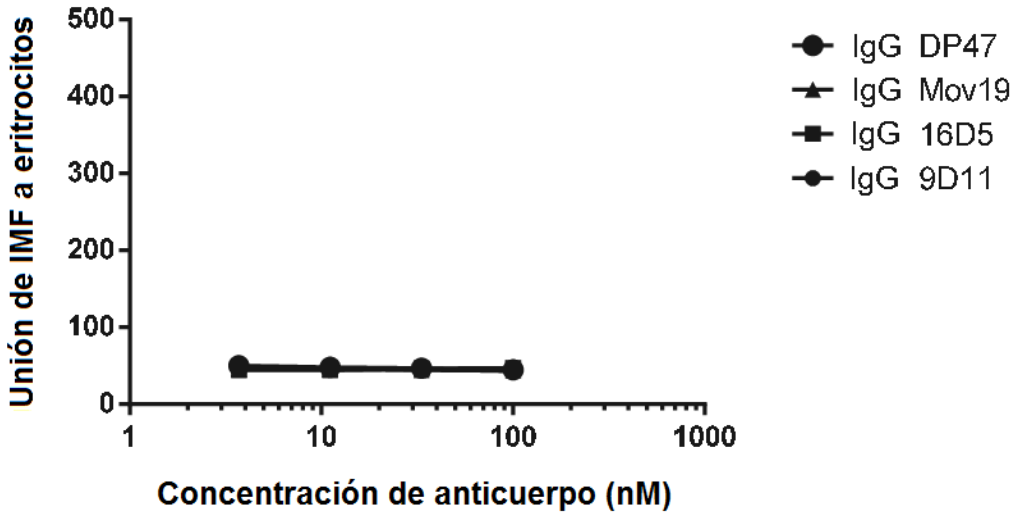

Unión de IMF a eritrocitos
500
400
300
200
100
0
1
10
100
1000
Concentración de anticuerpo (nM)
IgG DP47
IgG Mov19
IgG 16D5
IgG 9D11

Fig. 9A

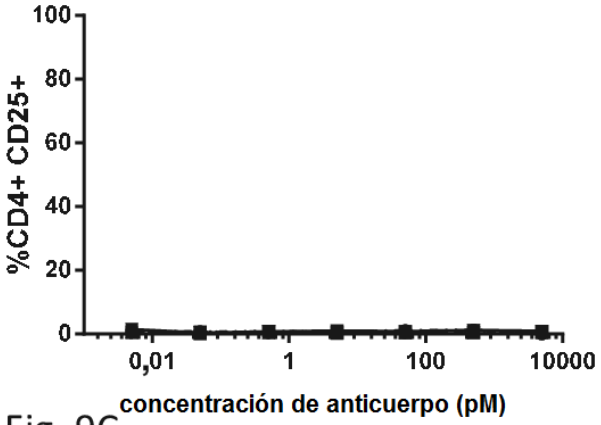


Fig. 9B

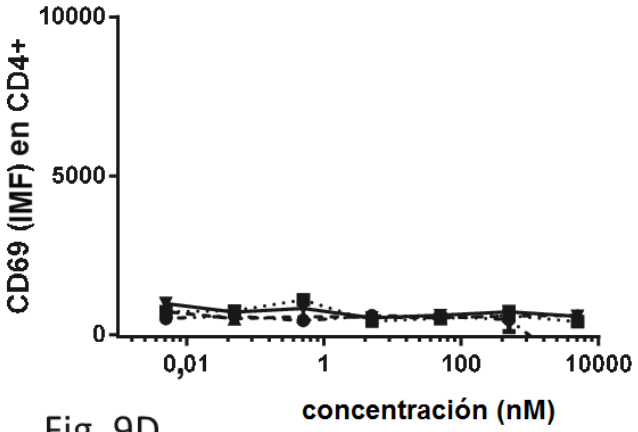


Fig. 9C

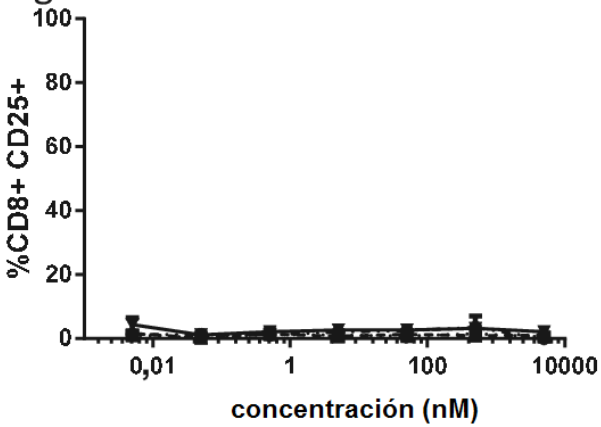
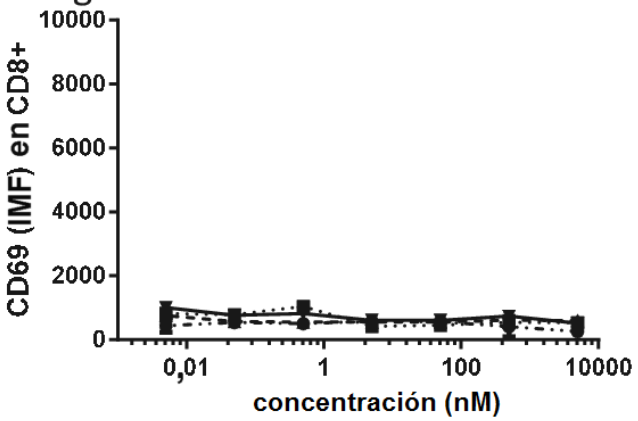


Fig. 9D



TCB Mov19 TCB 9D11 TCB 16D5 TCB DP47

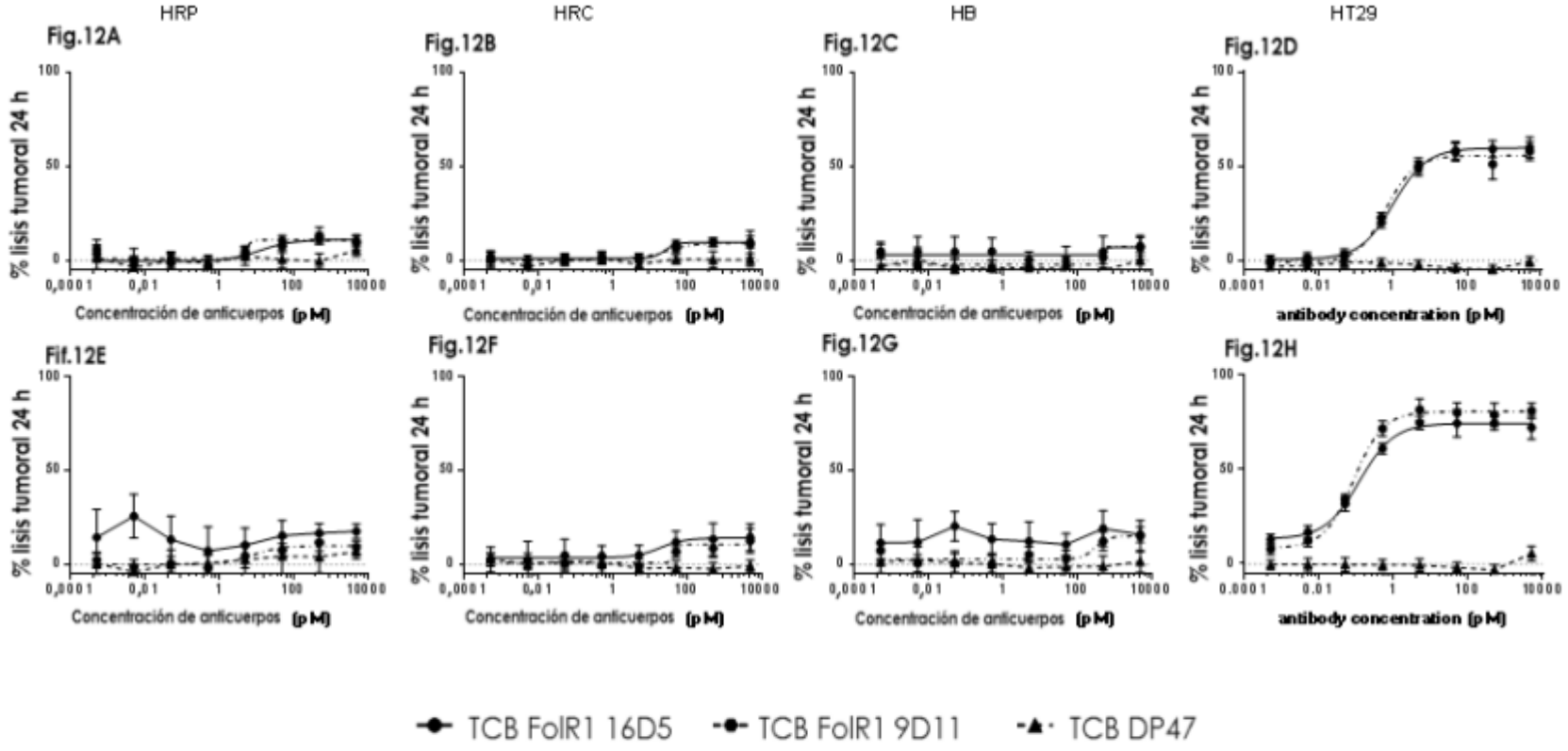

HRP
HRC
HB
HT29
Fig.12A
Fig.12B
Fig.12C
Fig.12D
Fif.12E
Fig.12F
Fig.12G
Fig.12H
% lisis tumoral 24 h
Concentración de anticuerpos (pM)
antibody concentration (pM)
TCB FolR1 16D5
TCB FolR1 9D11
TCB DP47

Fig. 12I

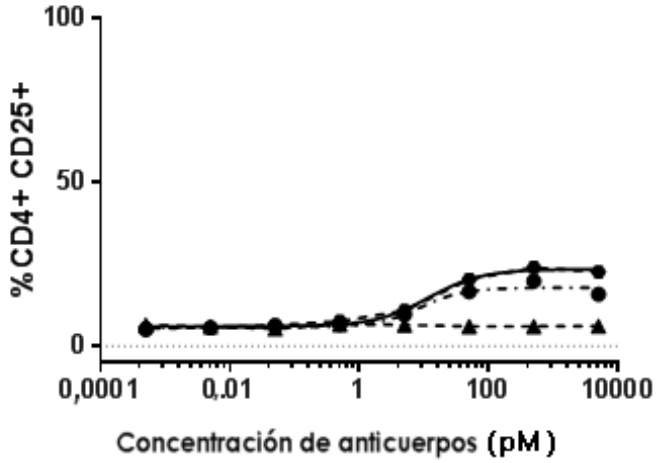


Fig.12J

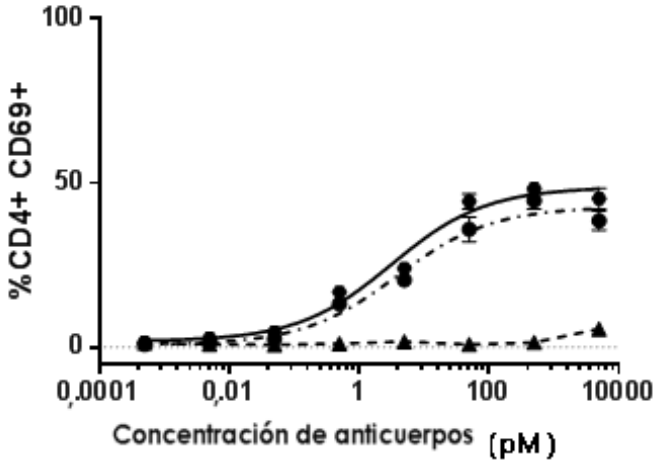


Fig.12K

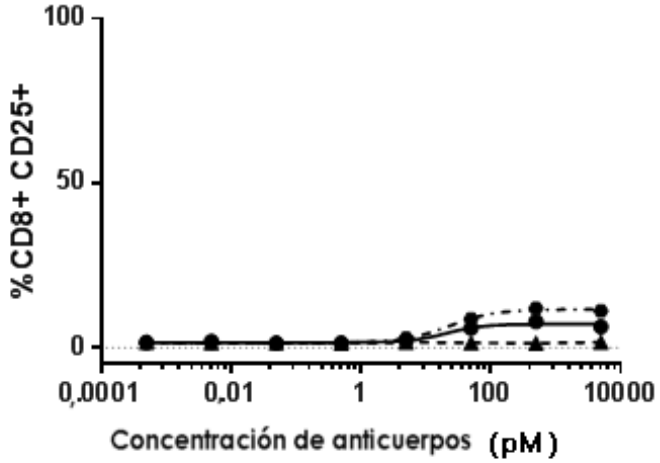
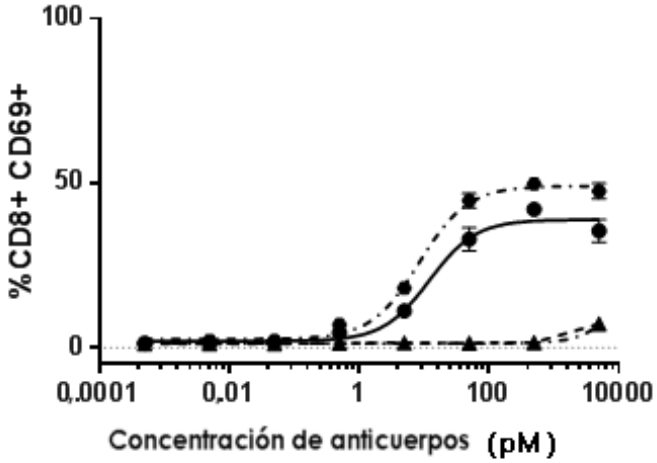


Fig.12L



TCB FolR1 16D5 TCB FolR1 9D11 TCB DP47

Fig. 12M

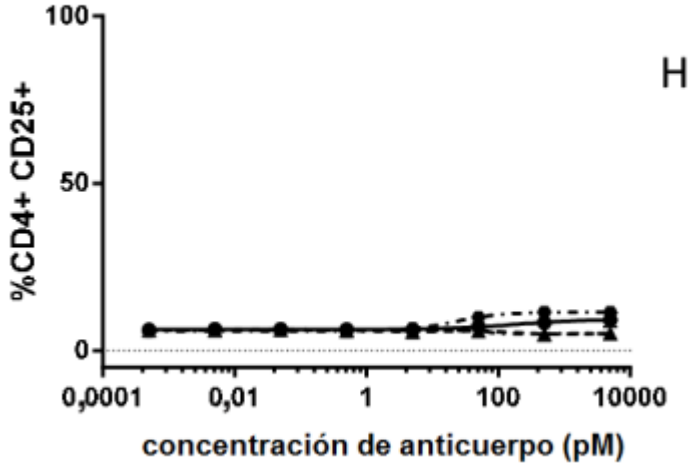


Fig. 12N

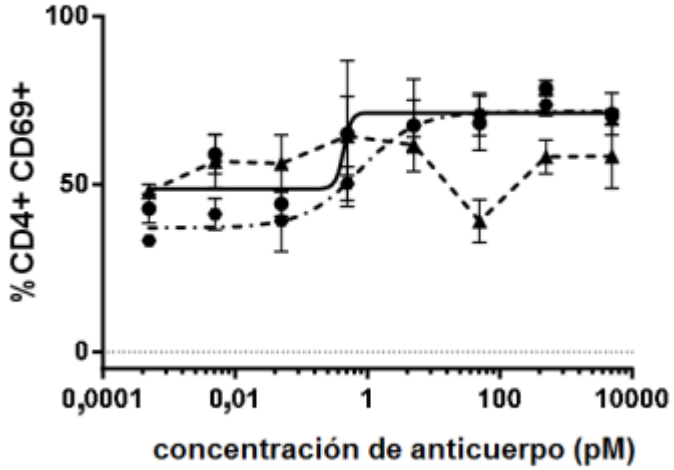


Fig. 12O

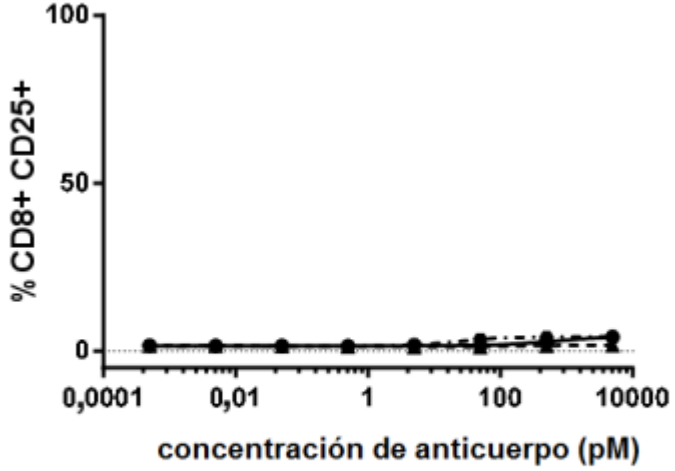
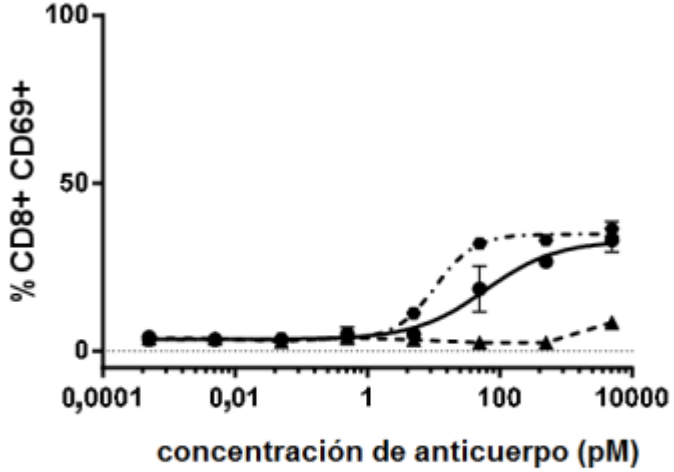
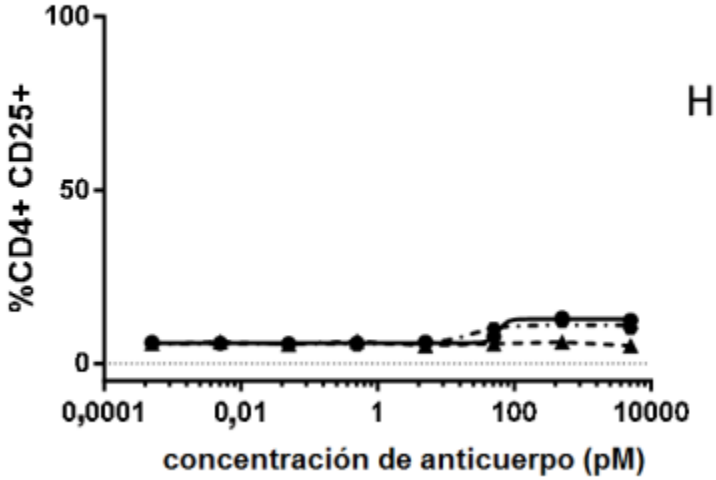


Fig. 12P



TCB de FolR1 16D5 — TCB de FolR1 9D11 — TCB de DP47

Fig. 12Q



HB

Fig. 12R

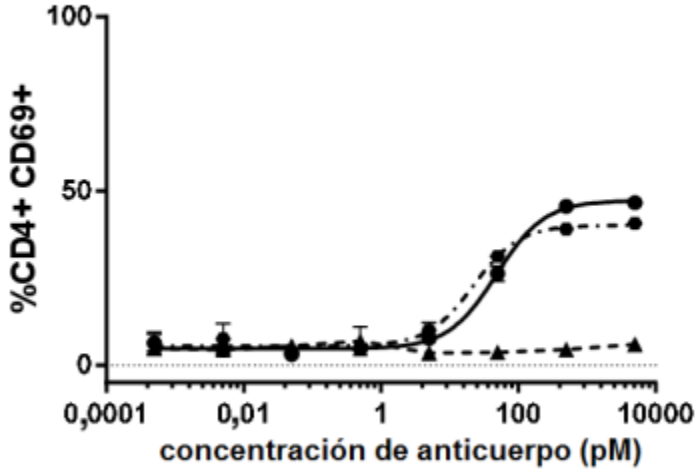


Fig. 12S

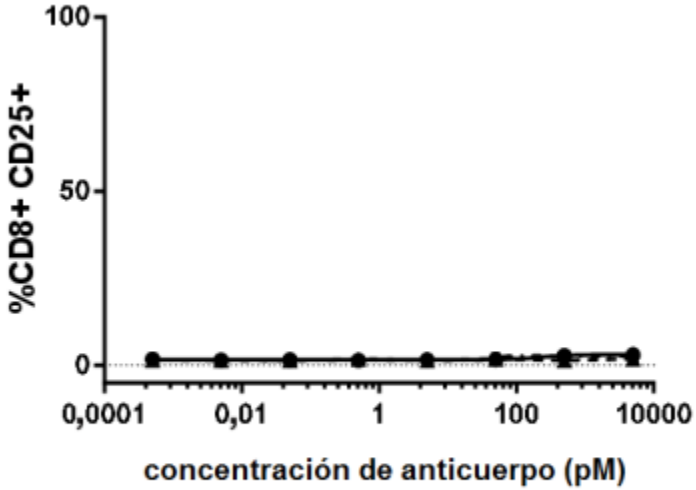
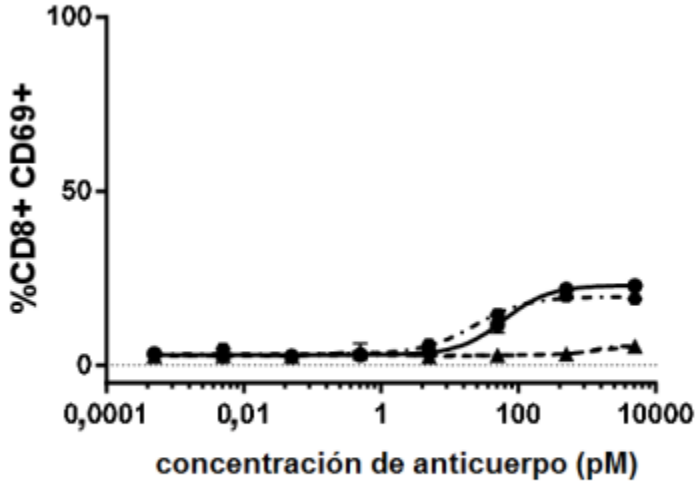
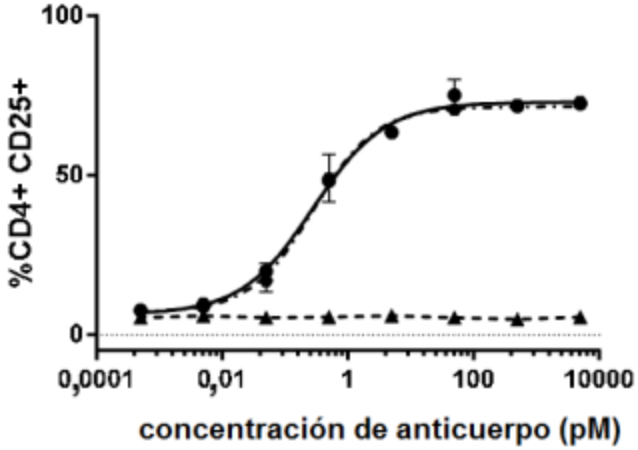


Fig. 12T



TCB de FolR1 16D5 TCB de FolR1 9D11 TCB de DP47

Fig. 12U



HT29

Fig. 12V

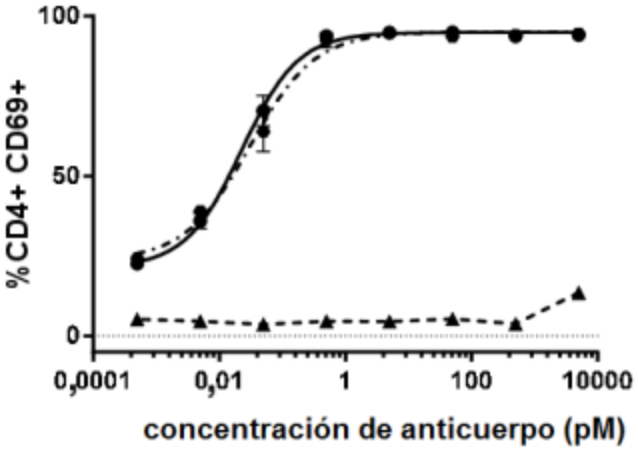


Fig. 12W

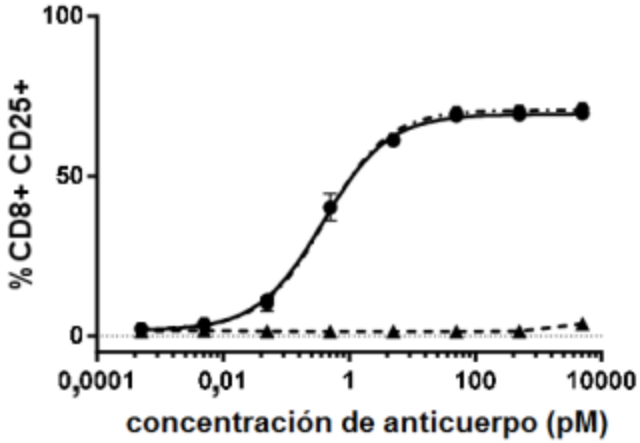
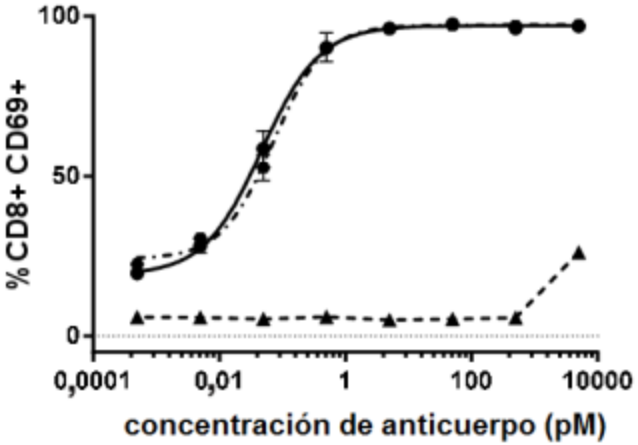


Fig. 12X



TCB de FolR1 16D5 — TCB de FolR1 9D11 — TCB de DP47

Fig. 13A

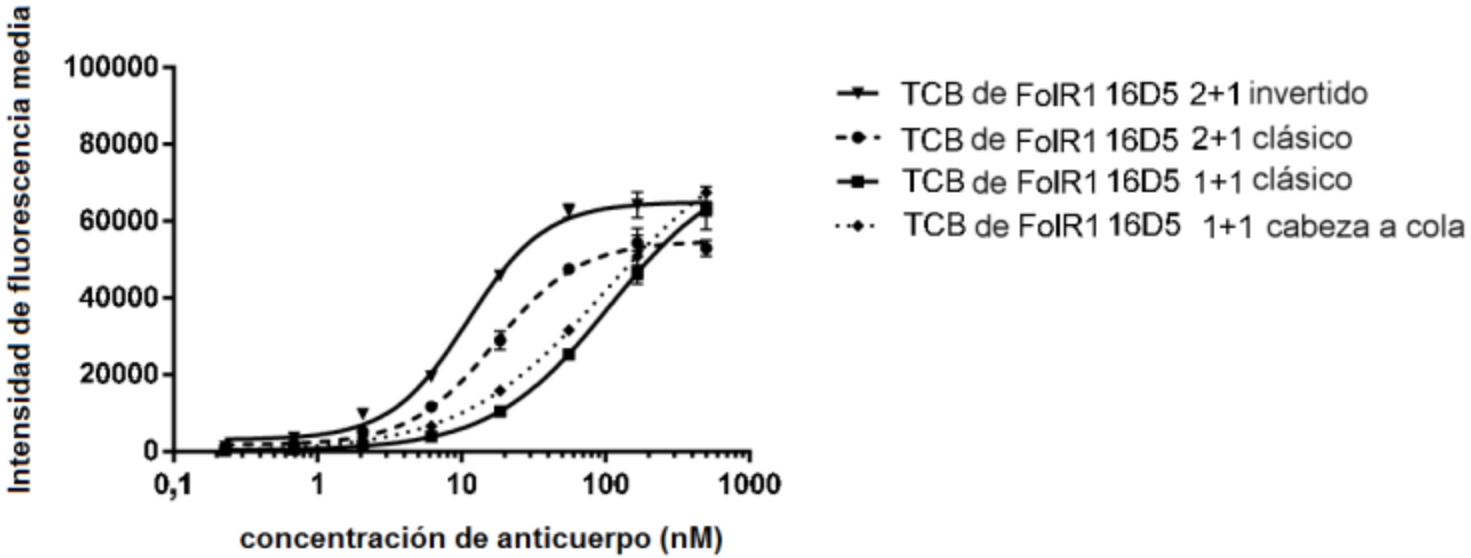

Intensidad de fluorescencia media
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,1
1
10
100
1000
concentración de anticuerpo (nM)
TCB de FolR1 16D5 2+1 invertido
TCB de FolR1 16D5 2+1 clásico
TCB de FolR1 16D5 1+1 clásico
TCB de FolR1 16D5 1+1 cabeza a cola

Fig. 13B

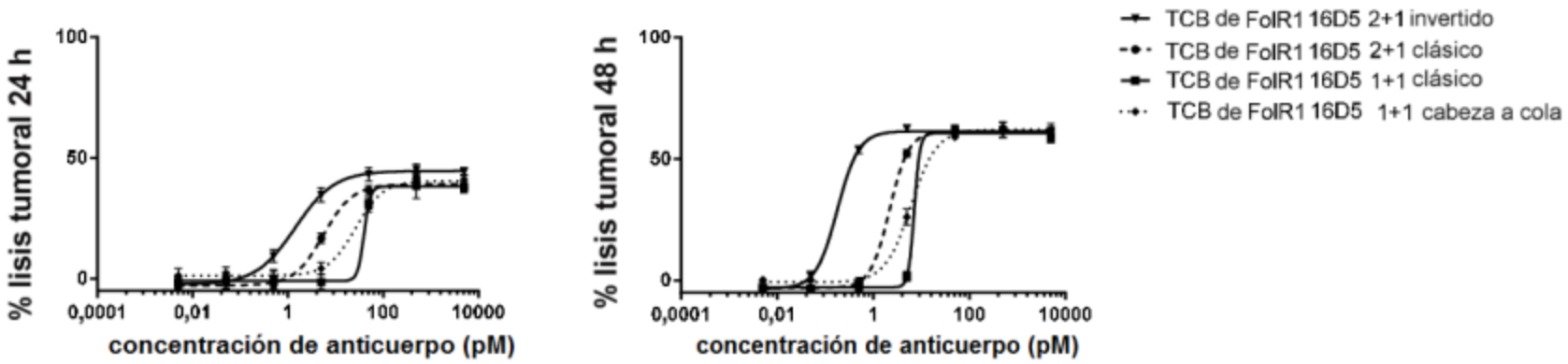

% lisis tumoral 24 h
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
concentración de anticuerpo (pM)
% lisis tumoral 48 h
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
concentración de anticuerpo (pM)
TCB de FolR1 16D5 2+1 invertido
TCB de FolR1 16D5 2+1 clásico
TCB de FolR1 16D5 1+1 clásico
TCB de FolR1 16D5 1+1 cabeza a cola

Fig. 13C

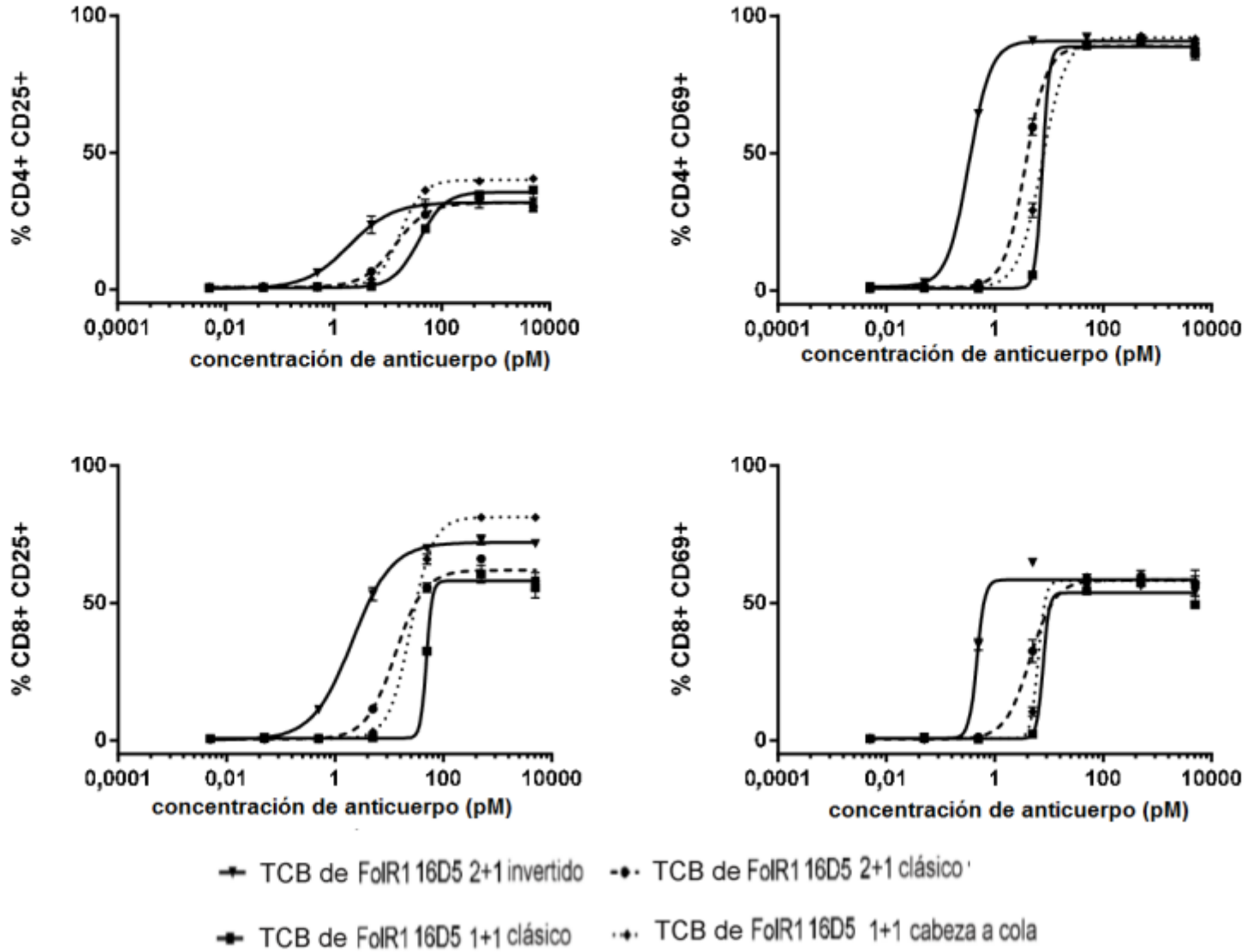
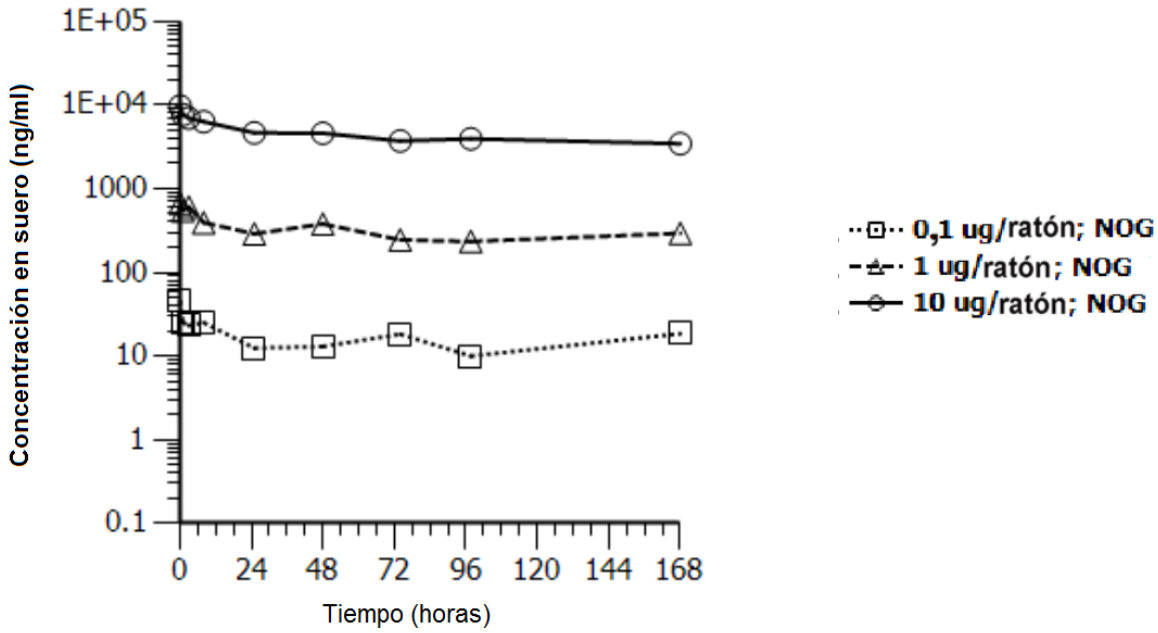

% CD4+ CD25+
% CD4+ CD69+
% CD8+ CD25+
% CD8+ CD69+
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
concentración de anticuerpo (pM)
TCB de FolR1 16D5 2+1 invertido
TCB de FolR1 16D5 2+1 clásico
TCB de FolR1 16D5 1+1 clásico
TCB de FolR1 16D5 1+1 cabeza a cola

Fig. 15



Dosis ug/ratón	Semivida Día
0,1	7,5
1	5,9
10	13,6

Fig. 16

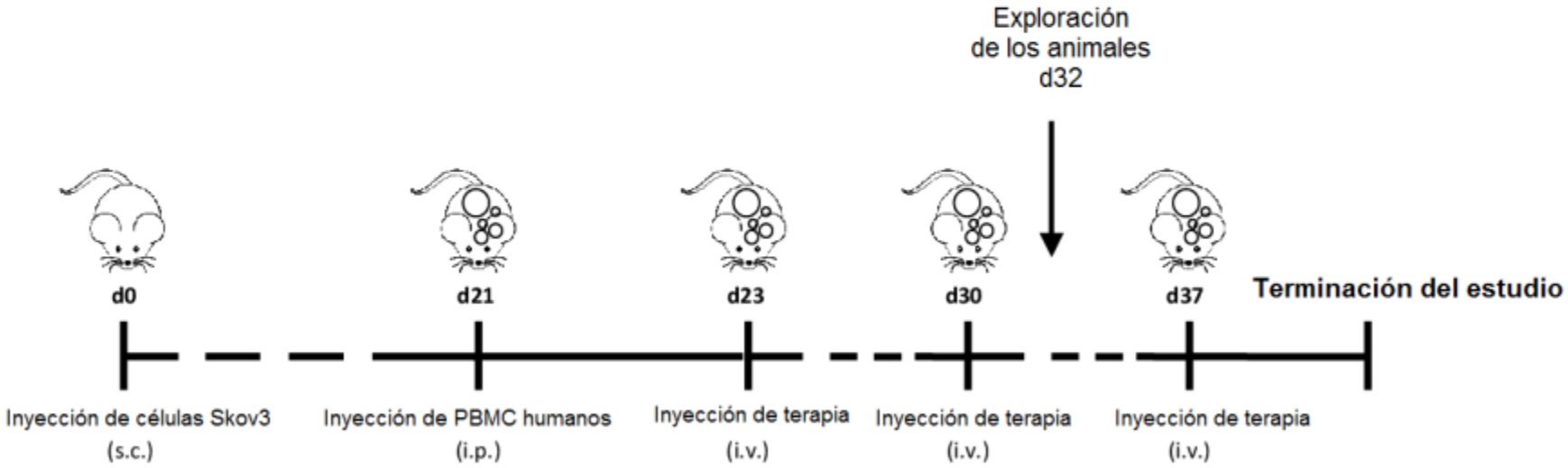

Exploración
de los animales
d32
d0
d21
d23
d30
d37
Terminación del estudio
Inyección de células Skov3
(s.c.)
Inyección de PBMC humanos
(i.p.)
Inyección de terapia
(i.v.)
Inyección de terapia
(i.v.)
Inyección de terapia
(i.v.)

Fig. 17A

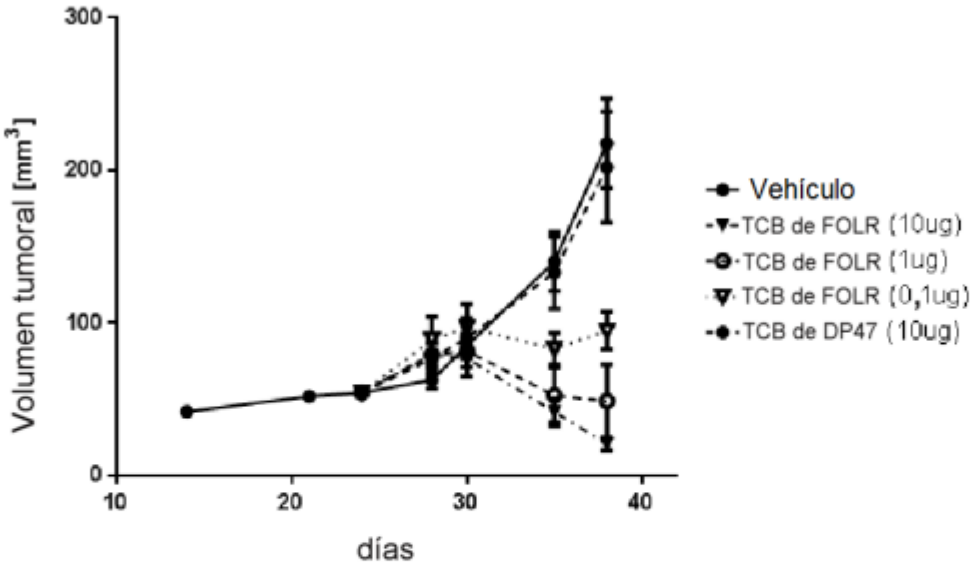


Fig. 17B

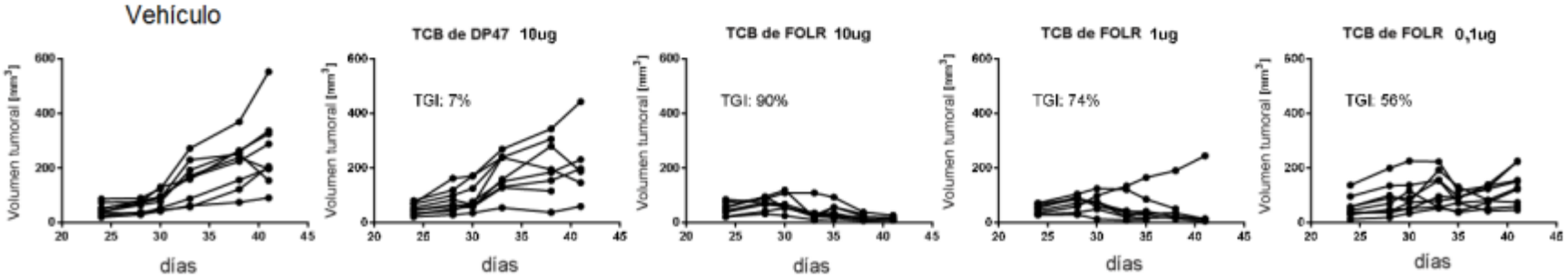
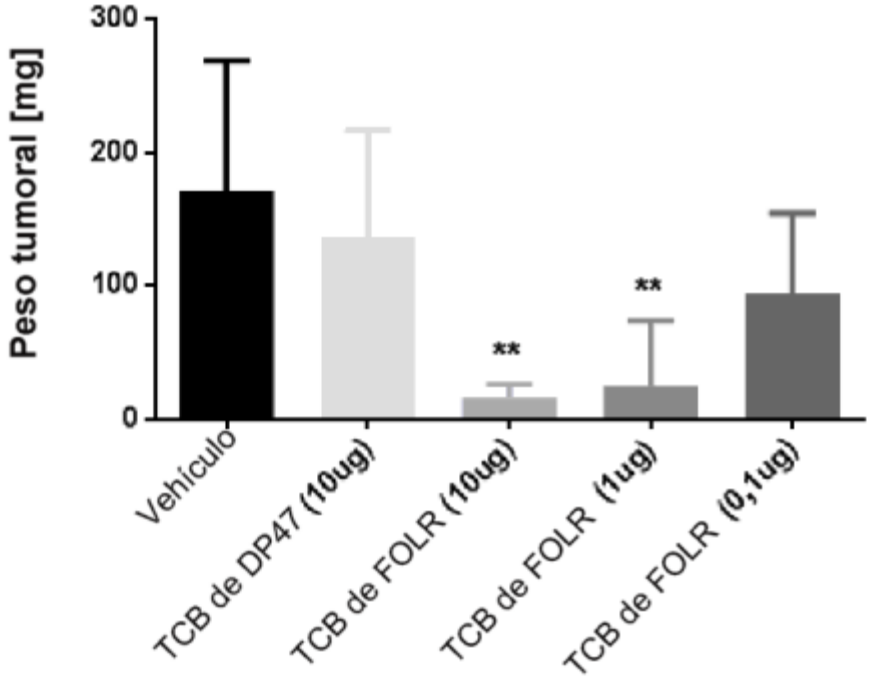


Fig. 18



** p≤0,01 (comparado con grupo de vehículo)
Prueba T: no emparejada, de dos colas

Fig. 19A

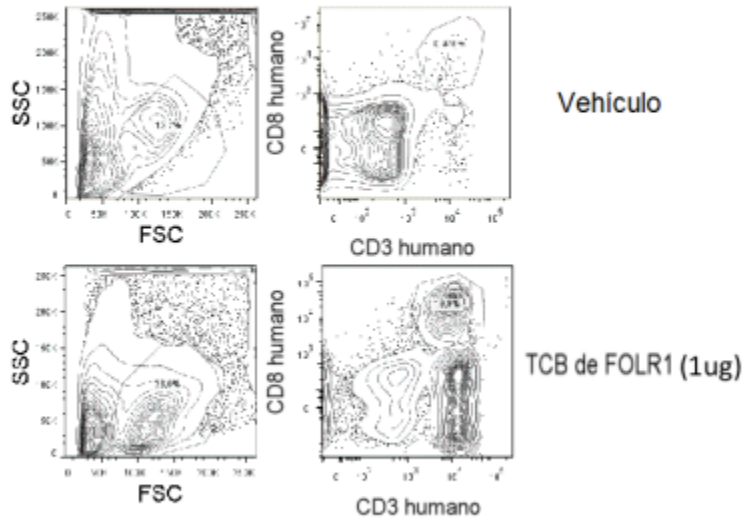
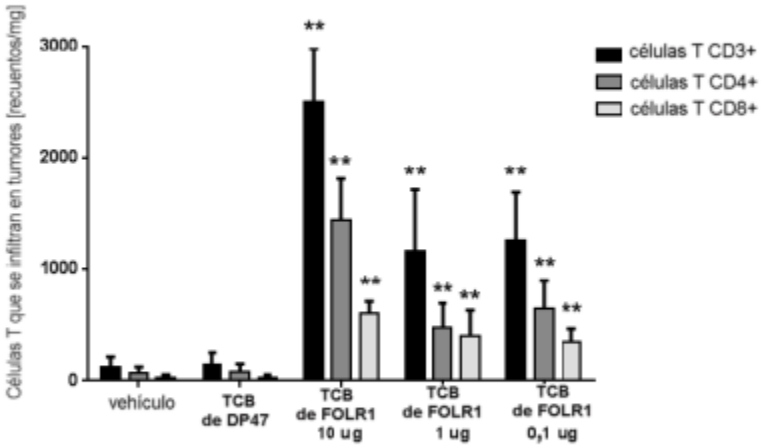


Fig. 19B



** $p \leq 0{,}01$ (comparado con grupo de vehículo)

Prueba T: no emparejada, de dos colas

Fig. 20A

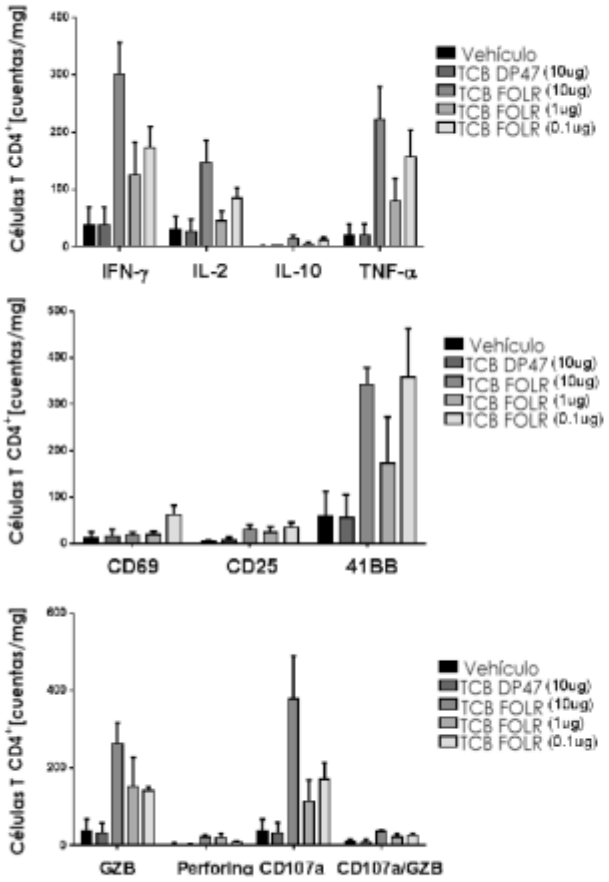


Fig. 20B

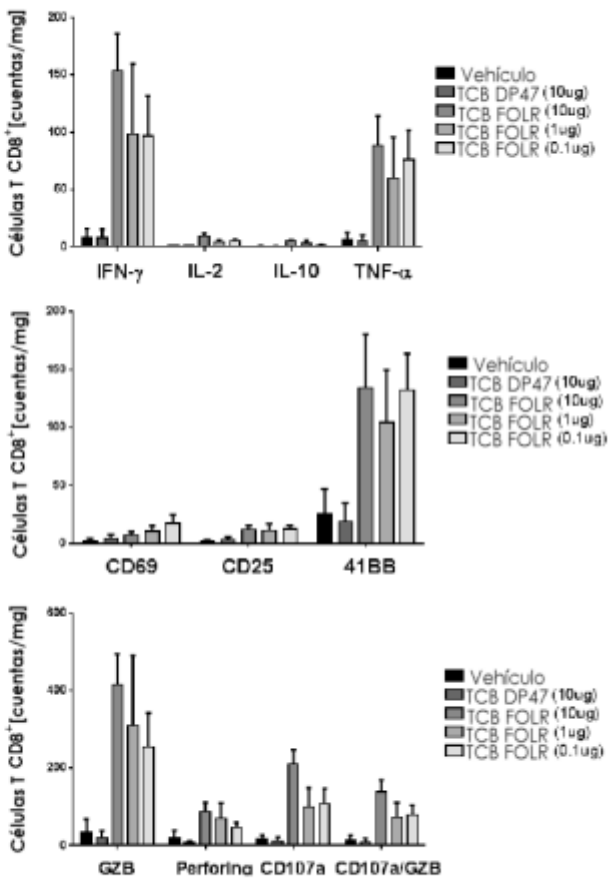


Fig. 21A

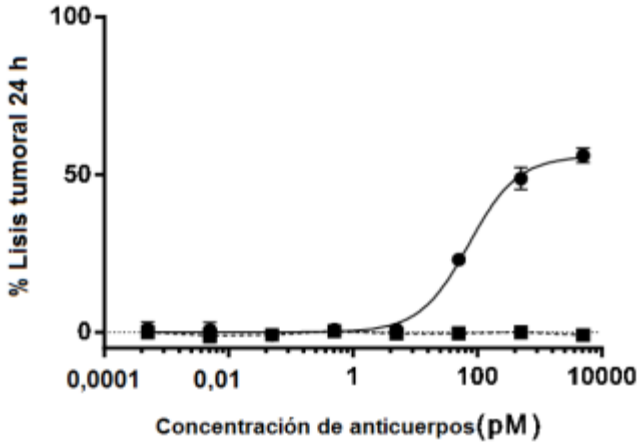
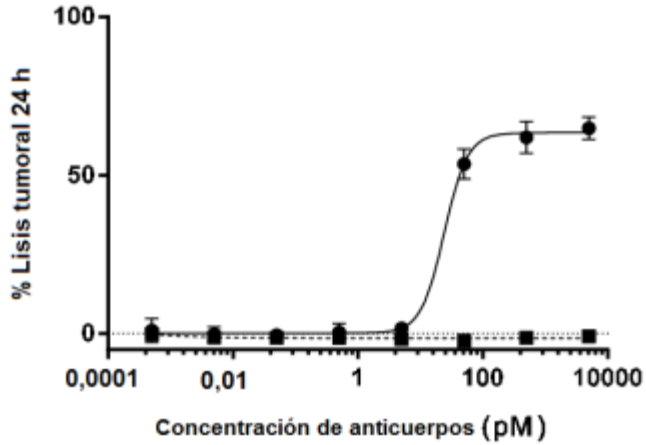


Fig. 21B



TCB DP47 TCB FolR1 kappa lambda

Fig. 22A

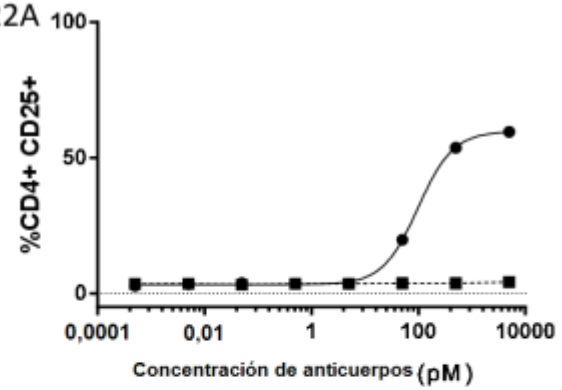


Fig. 22B

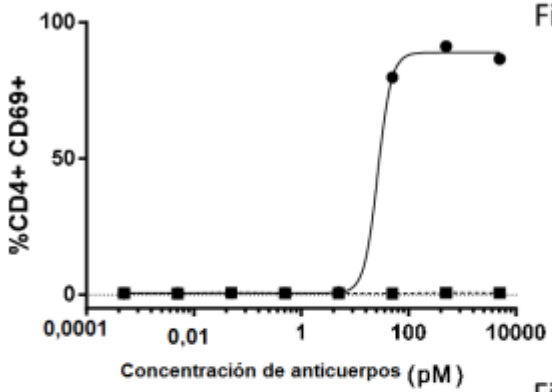


Fig. 22C

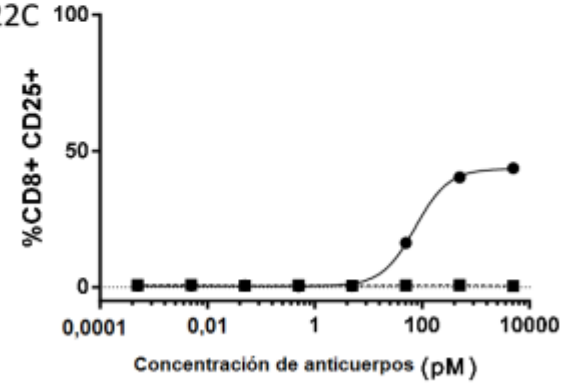
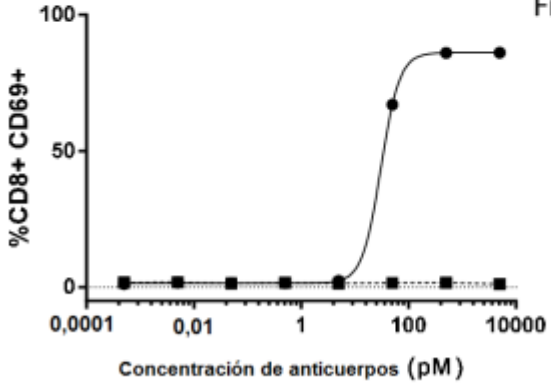


Fig. 22D



DP47 TCB

kappa lambda FolR1 TCB

Fig. 23A

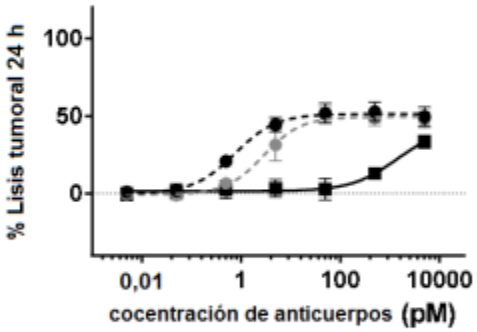
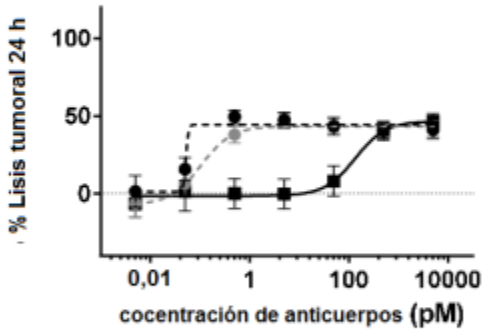


Fig. 23B



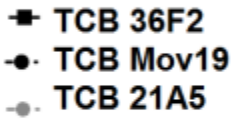


Fig. 24A

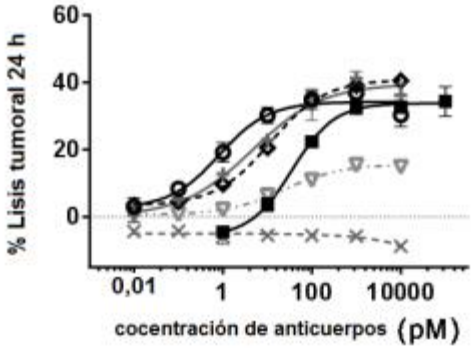


Fig. 24B

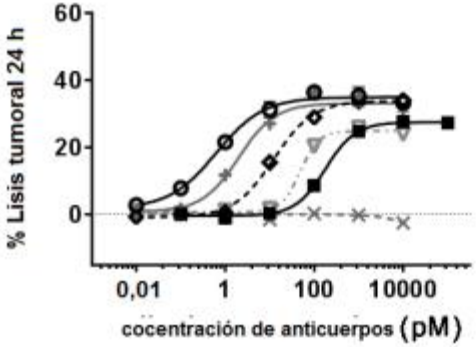
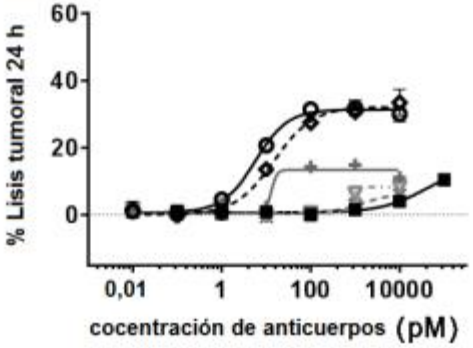


Fig. 24C



- TCB 36F2
- TCB 16D5
- TCB 16D5 clásico
- HT 16D5
- 16D5 1+1
- TCB DP47

Fig. 25A

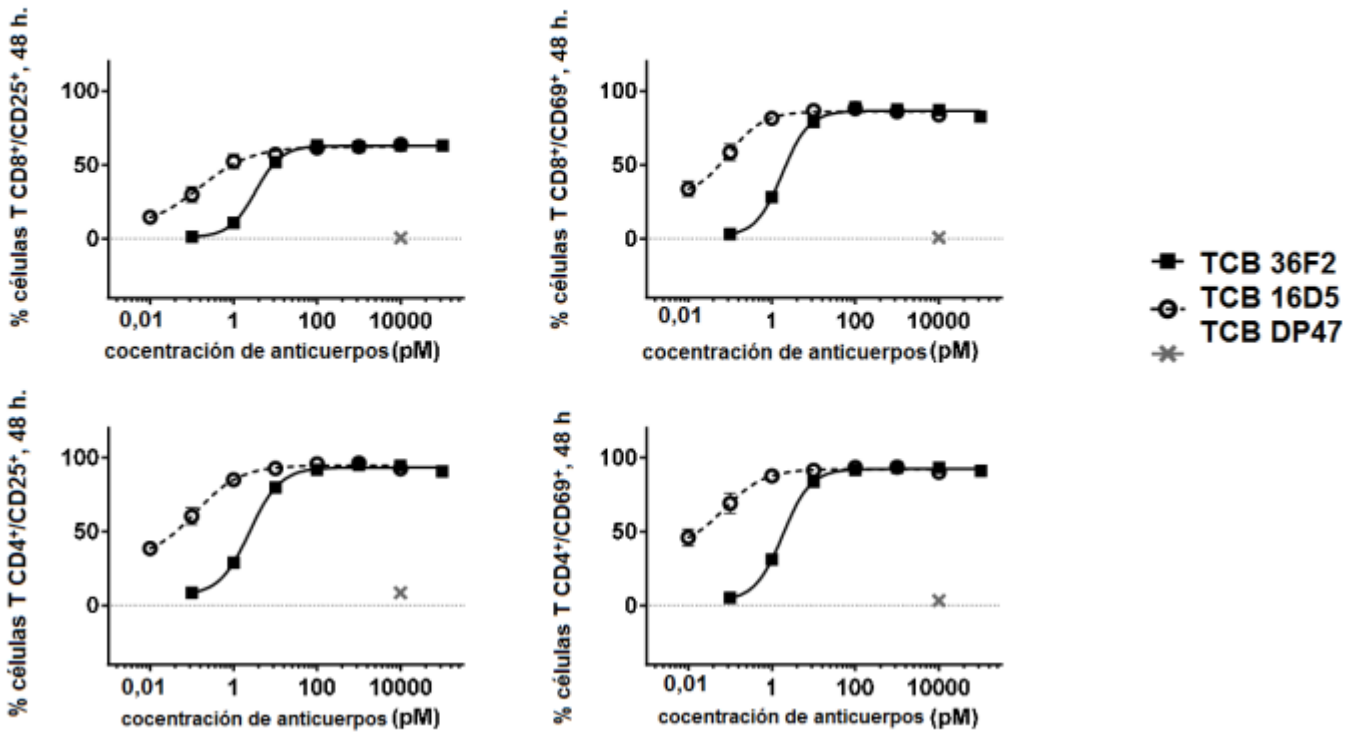

% células T CD8+/CD25+, 48 h.
% células T CD8+/CD69+, 48 h.
% células T CD4+/CD25+, 48 h.
% células T CD4+/CD69+, 48 h
100
50
0
0,01
1
100
10000
cocentración de anticuerpos (pM)
TCB 36F2
TCB 16D5
TCB DP47

Fig. 25B

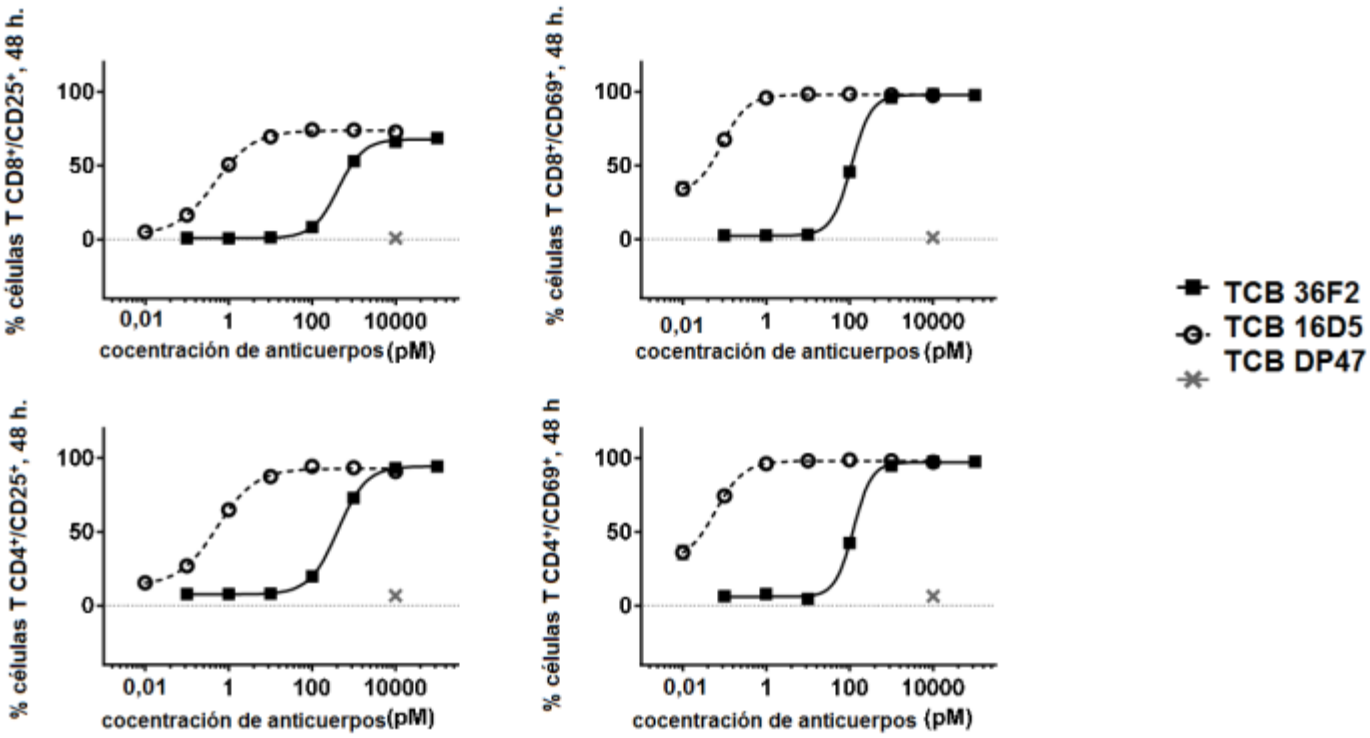

% células T CD8+/CD25+, 48 h.
100
50
0
0,01
1
100
10000
cocentración de anticuerpos (pM)
% células T CD8+/CD69+, 48 h.
% células T CD4+/CD25+, 48 h.
% células T CD4+/CD69+, 48 h
TCB 36F2
TCB 16D5
TCB DP47

Fig. 25C

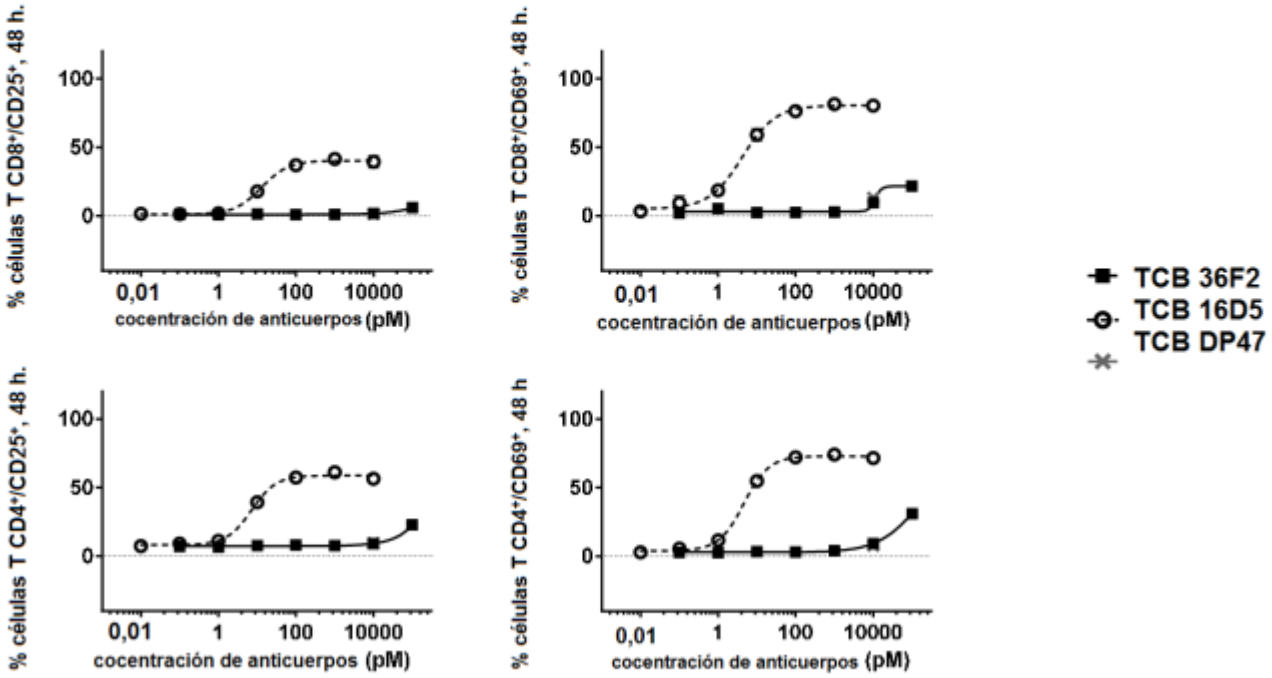

% células T CD8+/CD25+, 48 h.
% células T CD8+/CD69+, 48 h.
% células T CD4+/CD25+, 48 h.
% células T CD4+/CD69+, 48 h
100
50
0
0,01
1
100
10000
cocentración de anticuerpos (pM)
TCB 36F2
TCB 16D5
TCB DP47

Fig. 26A

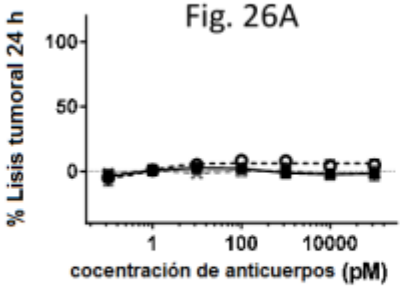


Fig. 26B

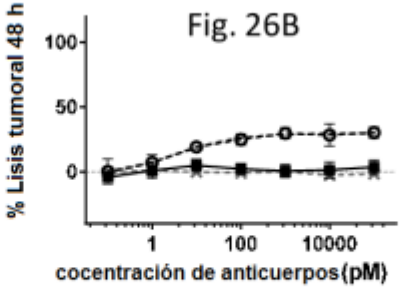


Fig. 26C

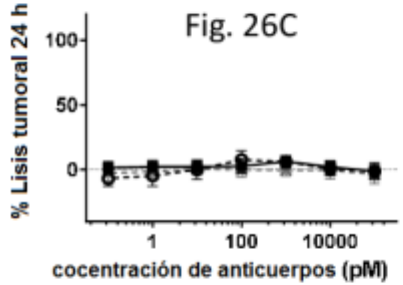


Fig. 26D

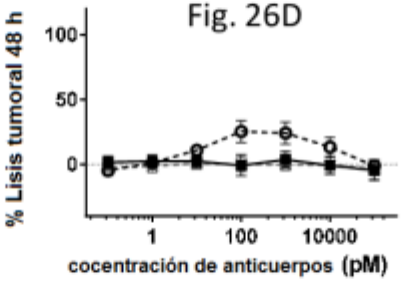


Fig. 26E

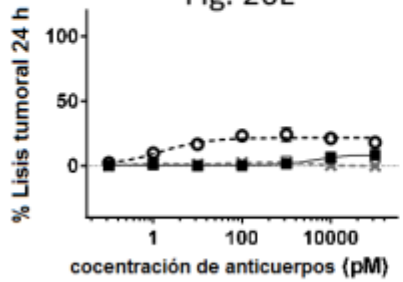
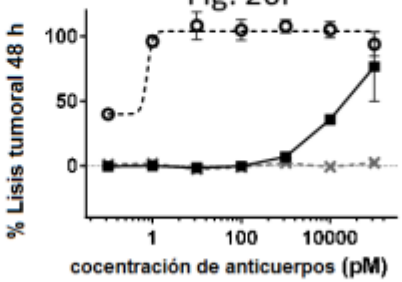


Fig. 26F



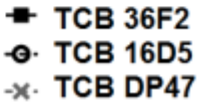


Fig. 27

Línea celular	Sitios de unión	Línea celular	Sitios de unión
Hela	2'240'716	Epitelio bronquial	492
Skov3	91'510	Epitelio del plexo coroide	104
OVCAR5	22'077	Epitelio cortical renal	312
HT29	10'135	Epitelio pigmentario retinal	822
MKN45	54	Skov3	69'890

Fig. 28A

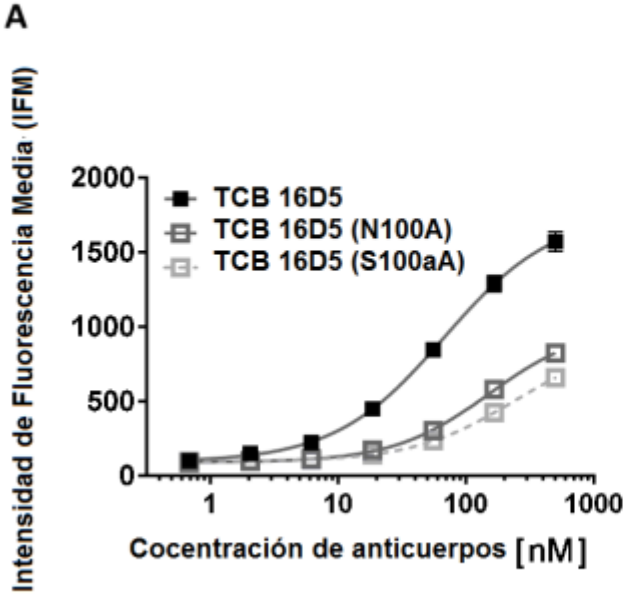
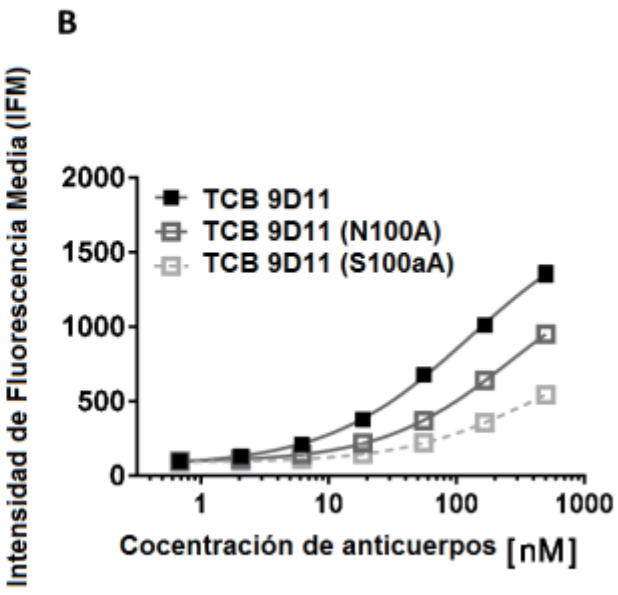


Fig. 28B



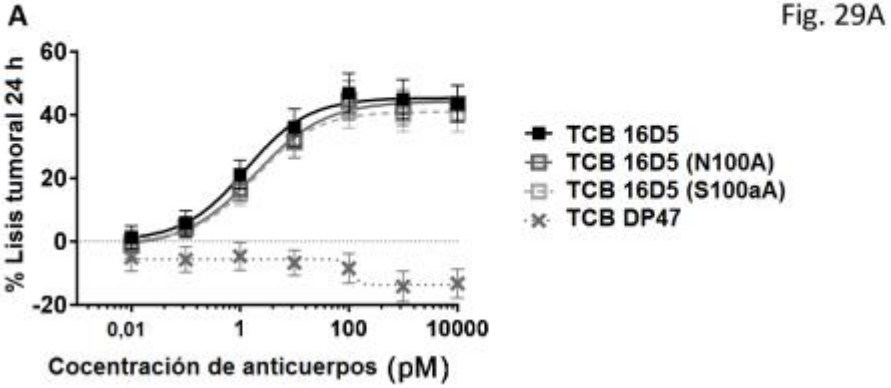


Fig. 29A

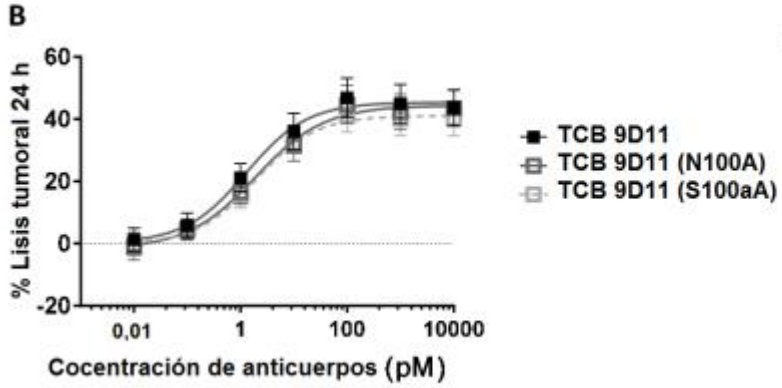


Fig. 29B

A

Fig. 30A

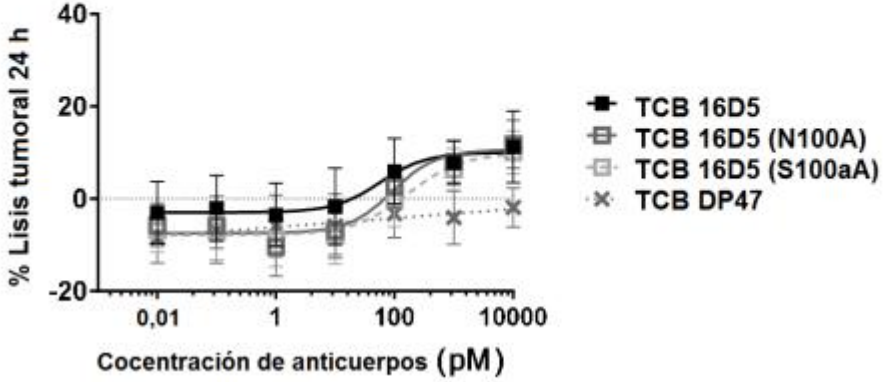

40
20
0
-20
% Lisis tumoral 24 h
0,01
1
100
10000
Cocentración de anticuerpos (pM)
TCB 16D5
TCB 16D5 (N100A)
TCB 16D5 (S100aA)
TCB DP47

Fig. 31A

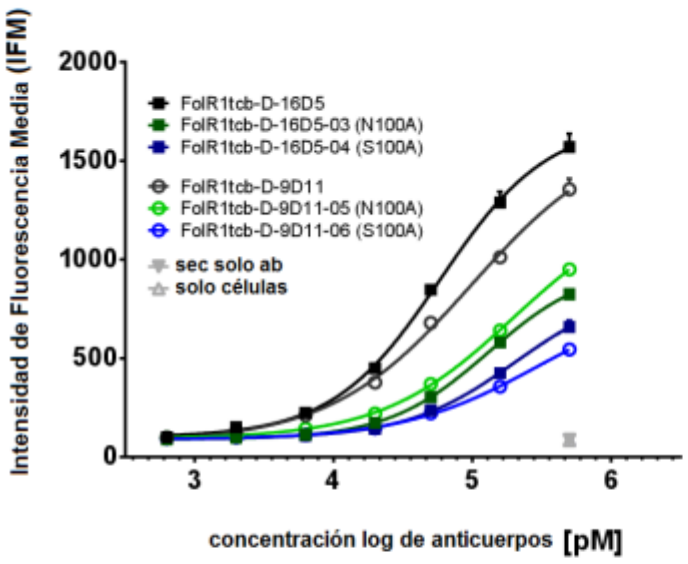
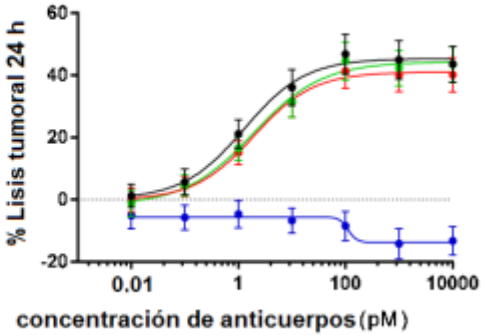


Fig. 31B



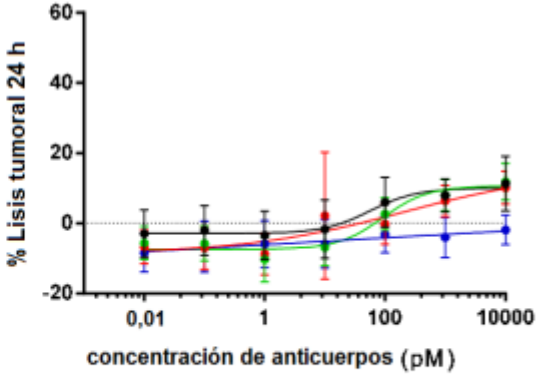


Fig. 31C

Fig. 32A

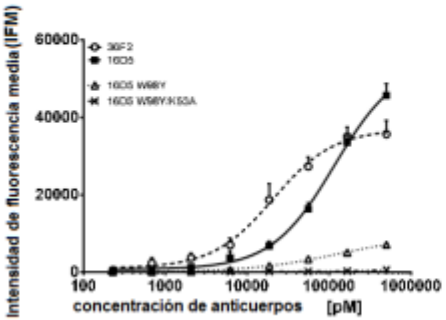


Fig. 32B

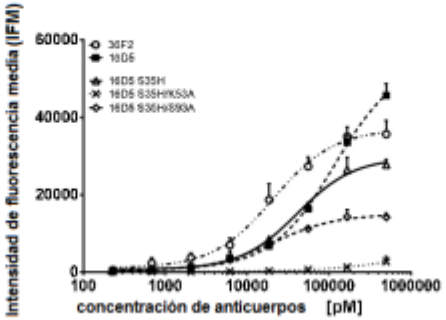


Fig. 32C

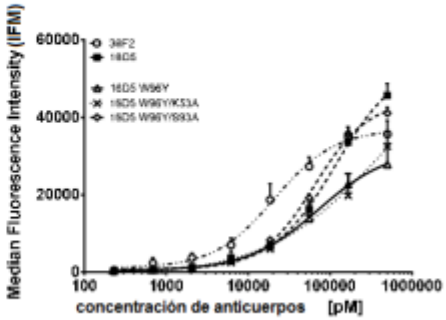


Fig. 32D

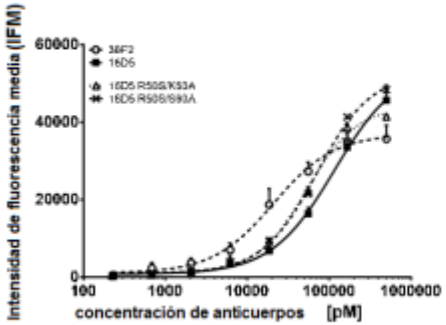


Fig. 32E

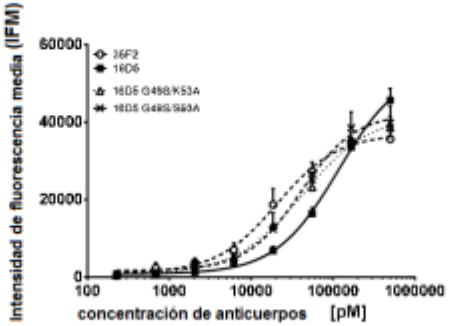


Fig. 33

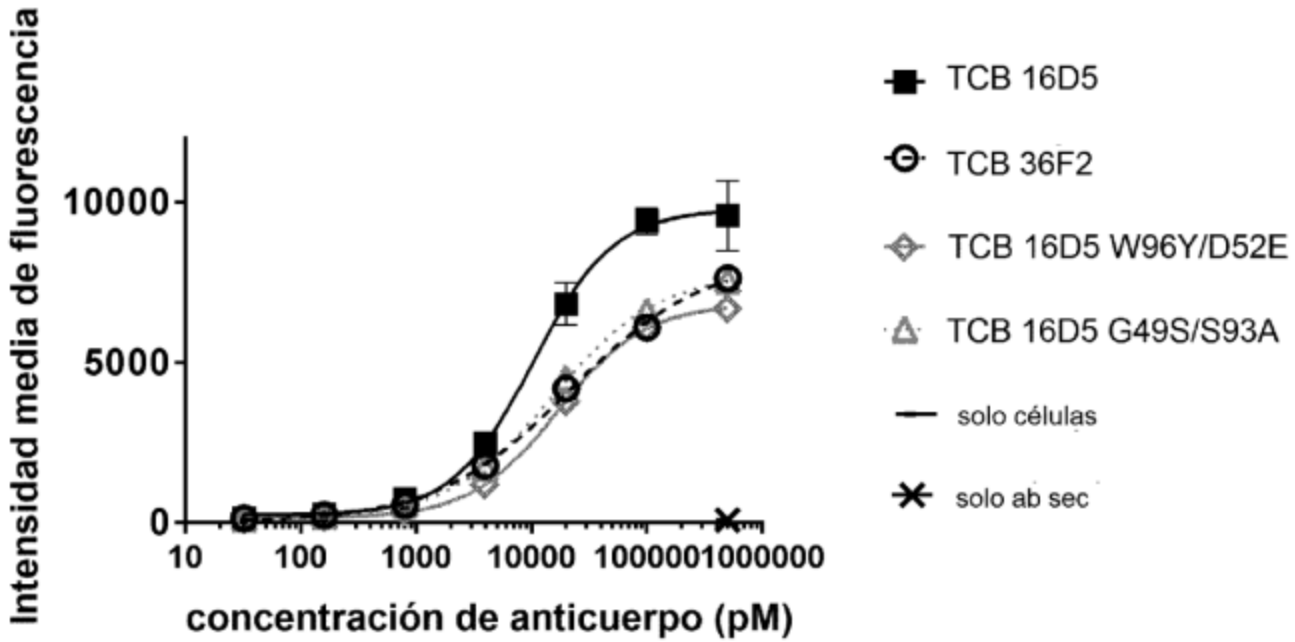

Intensidad media de fluorescencia
10000
5000
0
10
100
1000
10000
100000
1000000
concentración de anticuerpo (pM)
TCB 16D5
TCB 36F2
TCB 16D5 W96Y/D52E
TCB 16D5 G49S/S93A
solo células
solo ab sec

Fig. 34A

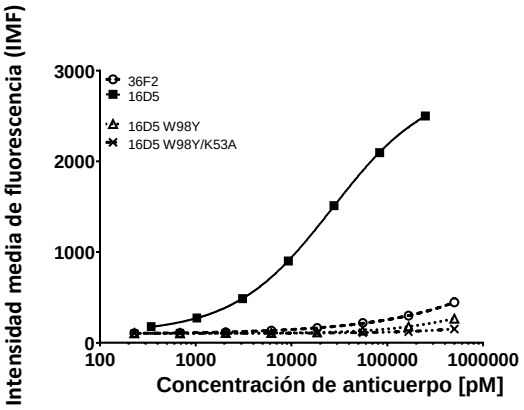


Fig. 34B

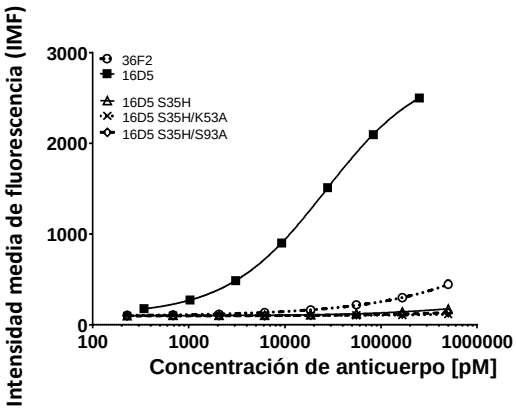


Fig. 34C

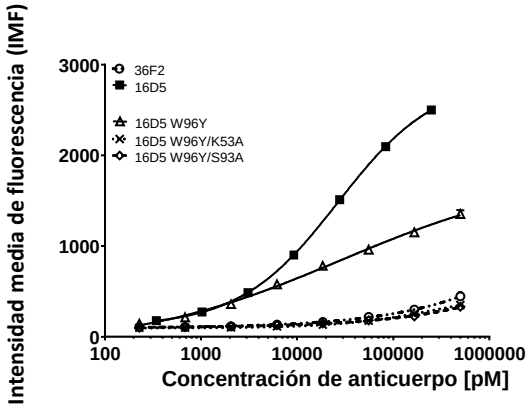


Fig. 34D

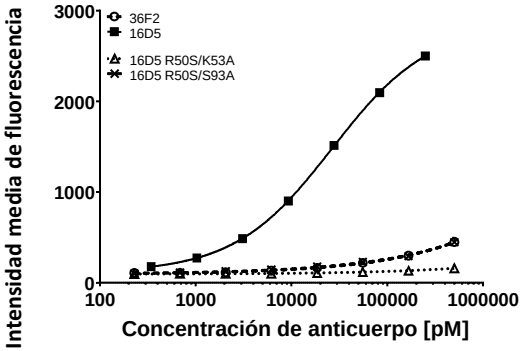


Fig. 34E

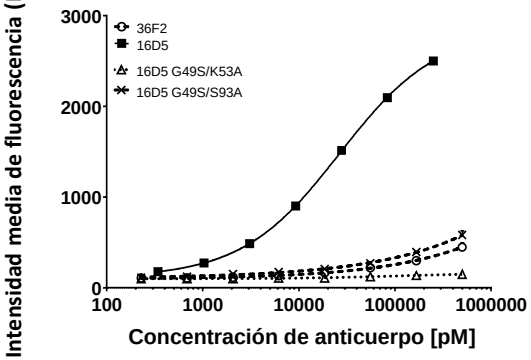


Fig. 35A

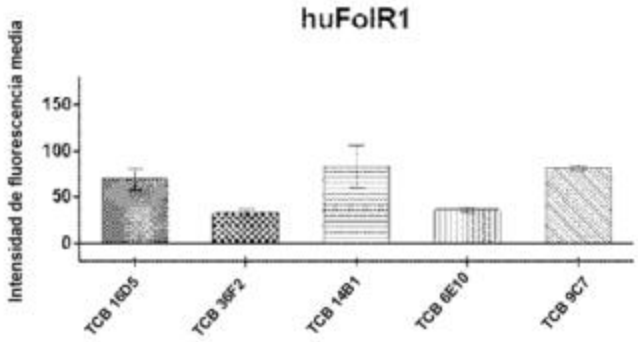
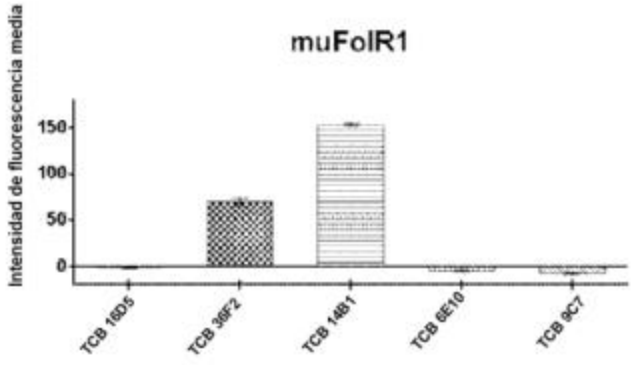


Fig. 35B



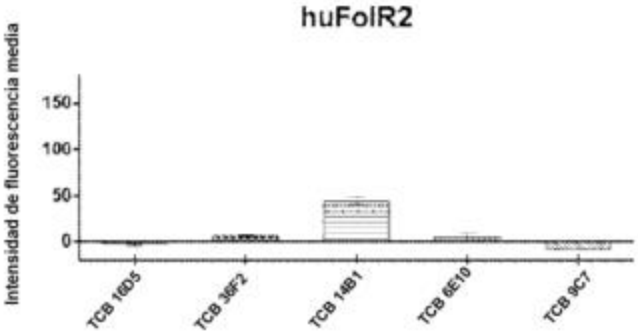


Fig. 35C

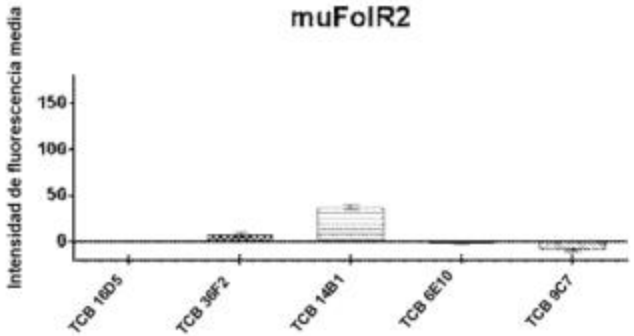


Fig. 35D

Fig. 36A

Fig. 36B

Fig. 36C

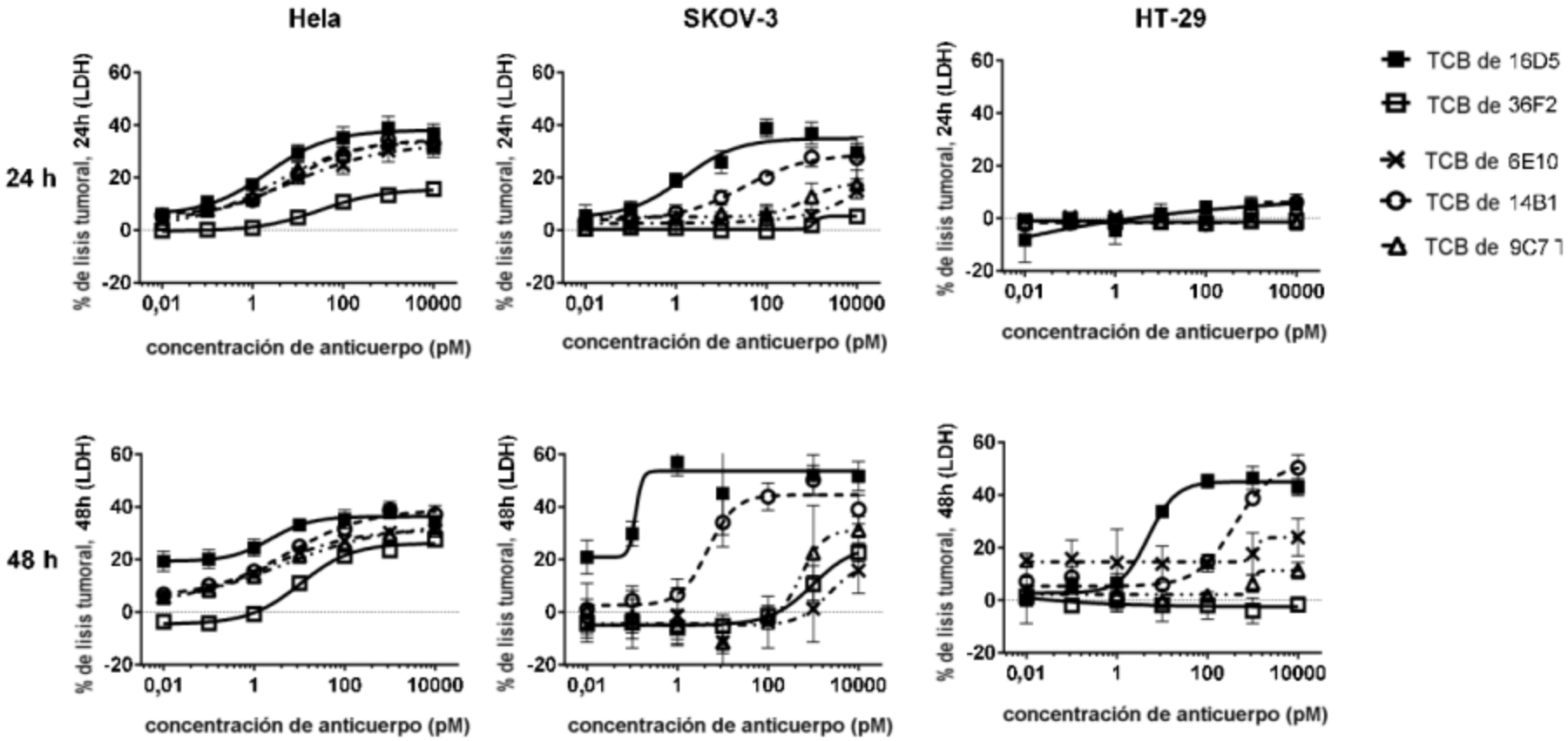


Fig. 36D

Fig. 36E

Fig. 36F

Fig. 37A

Fig. 37B

Fig. 37C

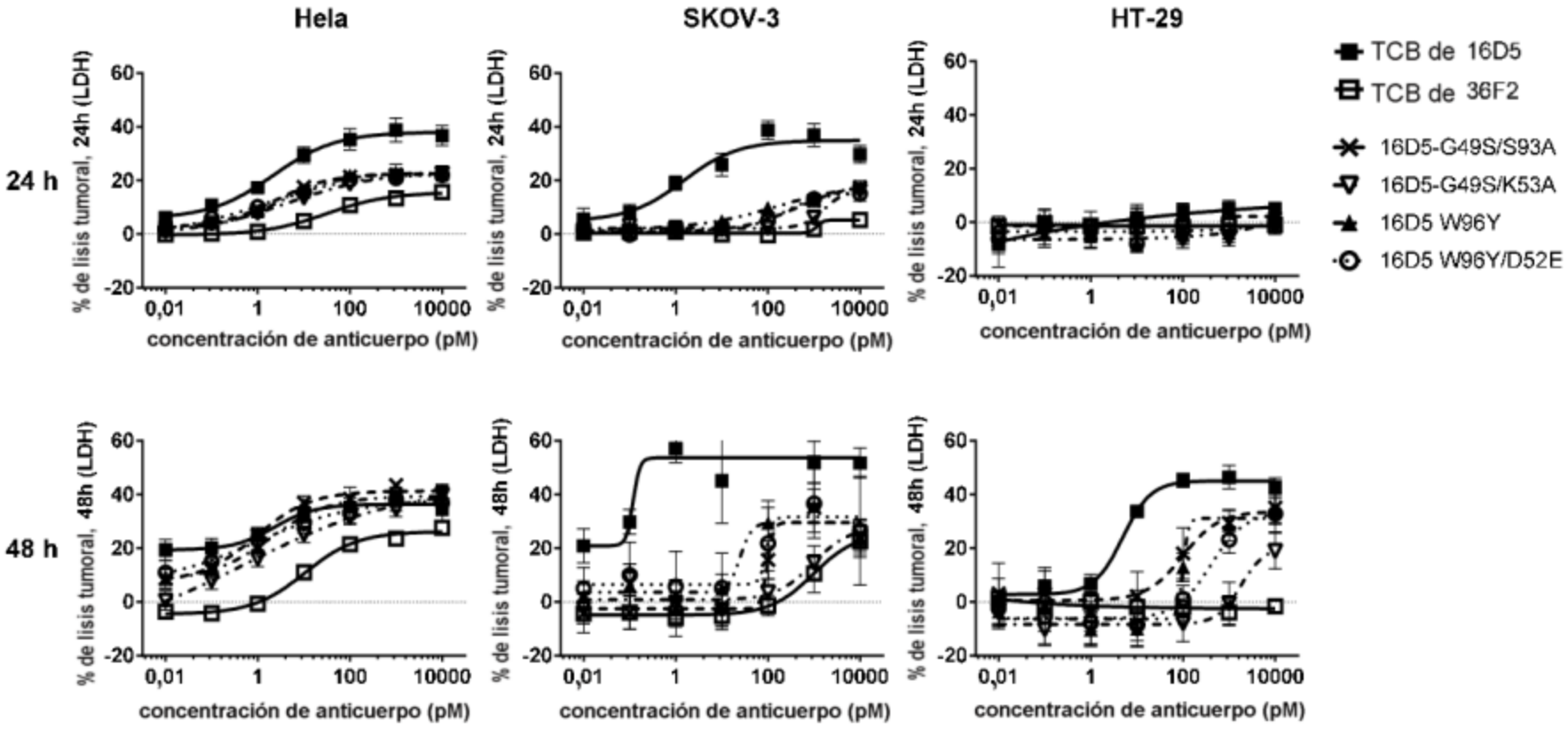


Fig. 37D

Fig. 37E

Fig. 37F

Fig. 38A

Fig. 38B

Fig. 38C

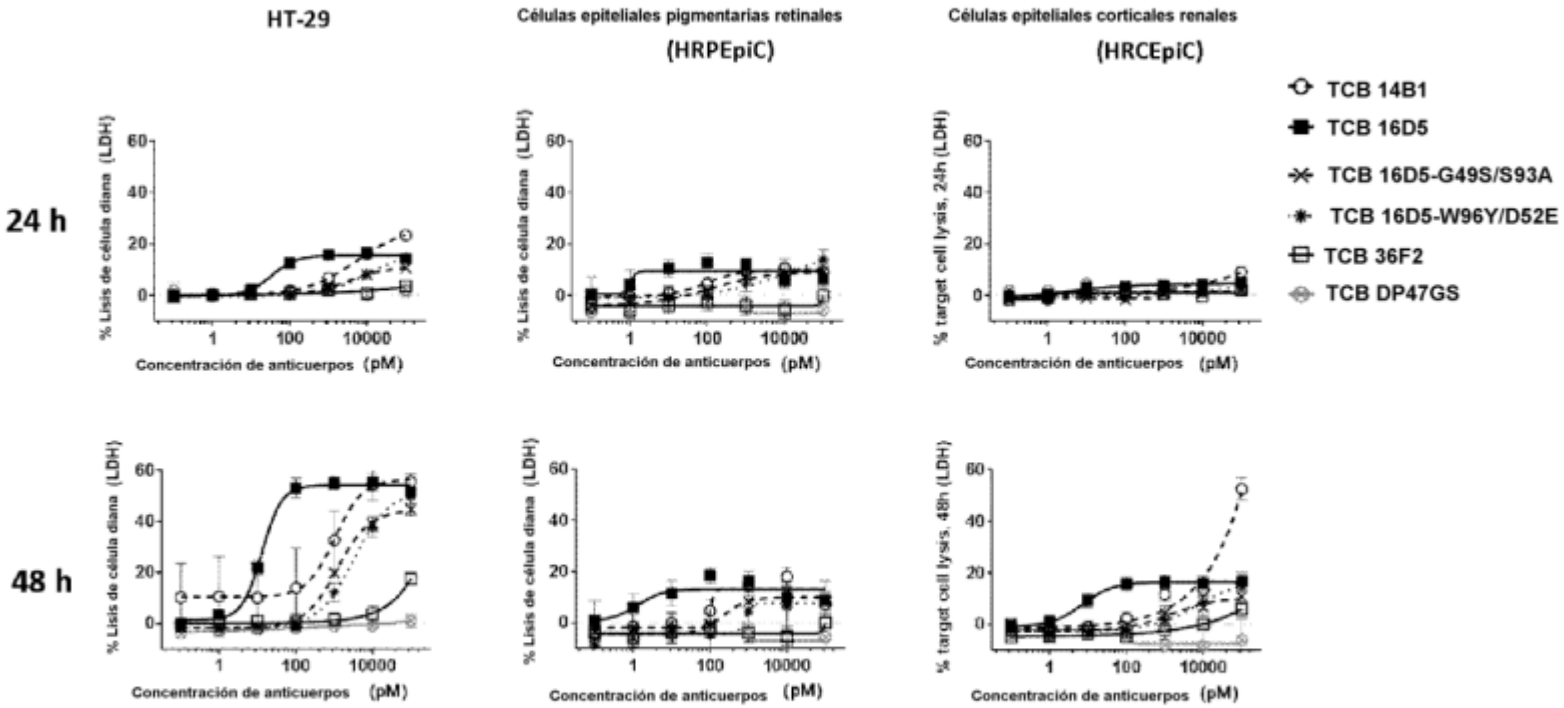


Fig. 38D

Fig. 38E

Fig. 38F

Fig. 39A

Grupo	Construcción	Cepa de ratón	Tumor	Dosis (mg/kg)	Molécula de unión	Semivida (días)	Cmáx (ug/ml)
A	TCB de FOLR1 (clon: 16D5 W96Y/D52E)	NOG	No	0,5	16D5 W96Y/D52E	10,6	16
B	TCB de FOLR1 (clon: 16D5 G49S/S93A)	NOG	No	0,5	16D5 G49S/S93A	4,35	11
C	TCB de FOLR1 (clon: 16D5)	NOG	No	0,5	16D5	13,6	10
D	TCB de FOLR1 (clon: 36F2)	NOG	No	0,5	36F2	3,6	9

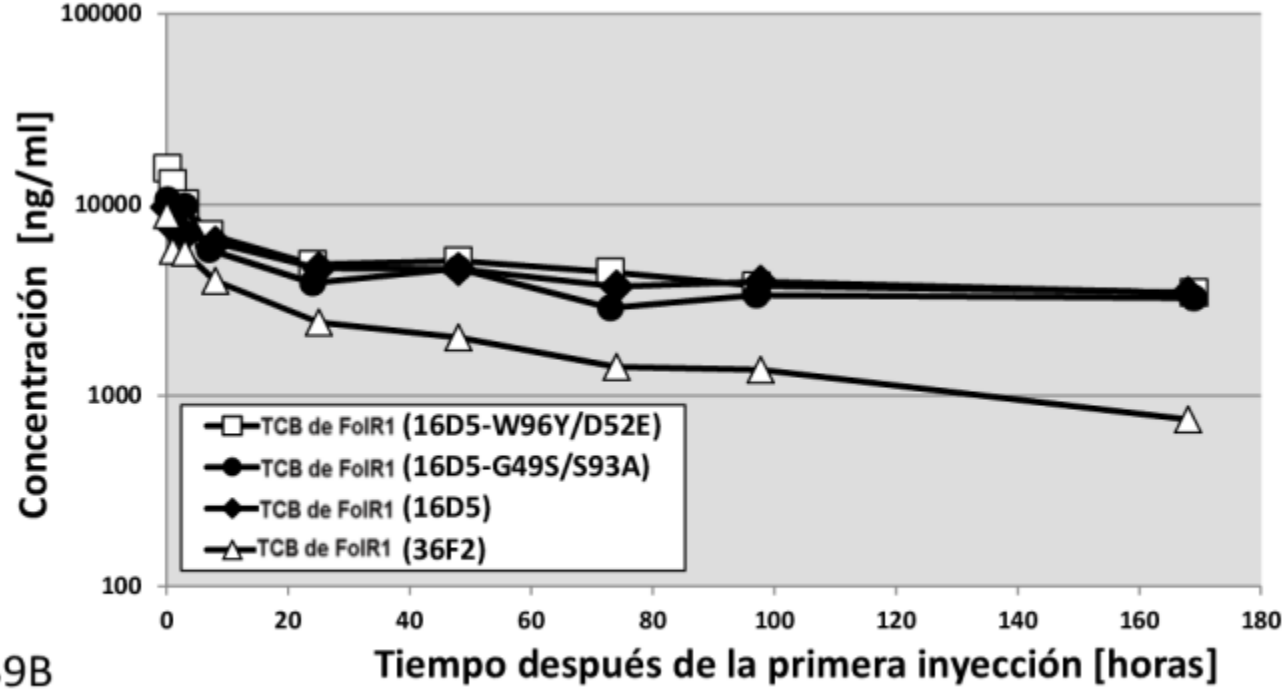


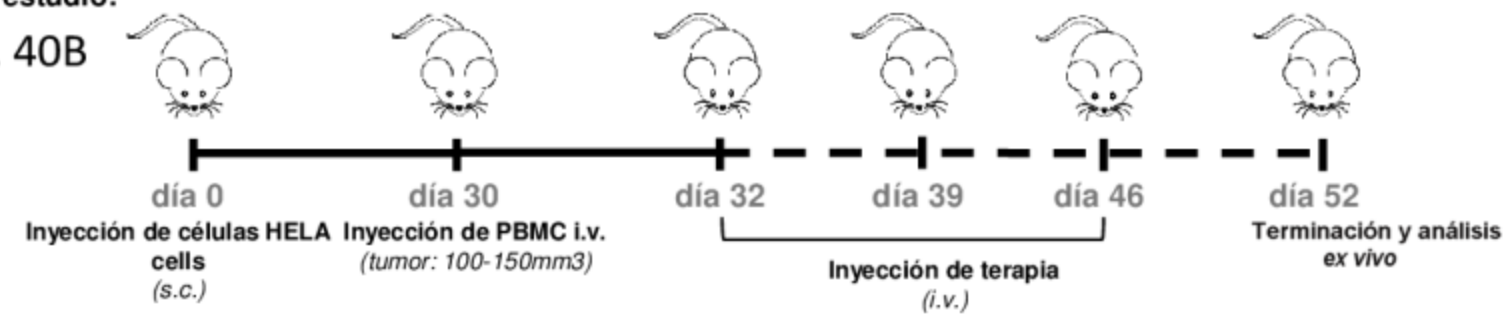
Fig. 39B

Fig. 40A

Grupo	Construcción	Inyección de PMBC (día 30)	Tumor (s.c.)	Inicio del tratamiento	Dosis (mg/kg)	Pauta
A	Vehículo	$10x10^6$	HELA	Día 32	--	una por semana
B	TCB de FOLR1 (clon: 16D5)	$10x10^6$	HELA	Día 32	0,5	una por semana
C	TCB de FOLR1 (clon: 16D5 W96Y/D52E)	$10x10^6$	HELA	Día 32	2,5	una por semana
D	TCB de FOLR1 (clon: 16D5 W96Y/D52E)	$10x10^6$	HELA	Día 32	0,5	una por semana
E	TCB de FOLR1 (clon: 16D5 G49S/S93A)	$10x10^6$	HELA	Día 32	2,5	una por semana
F	TCB de FOLR1 (clon: 16D5 G49S/S93A)	$10x10^6$	HELA	Día 32	0,5	una por semana

Protocolo del estudio:

Fig. 40B



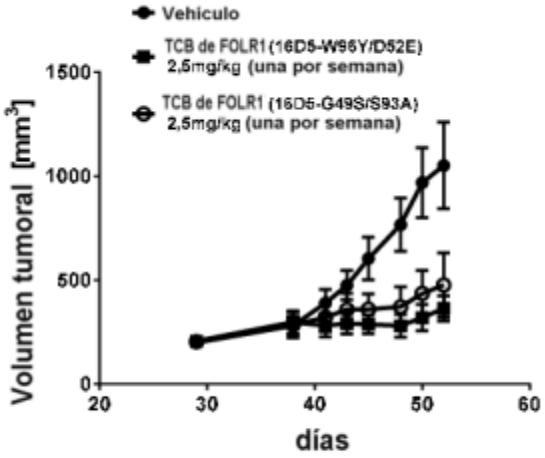


Fig. 40C

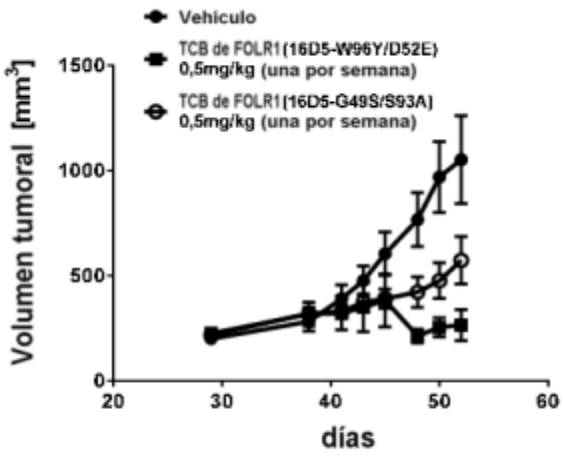


Fig. 40D

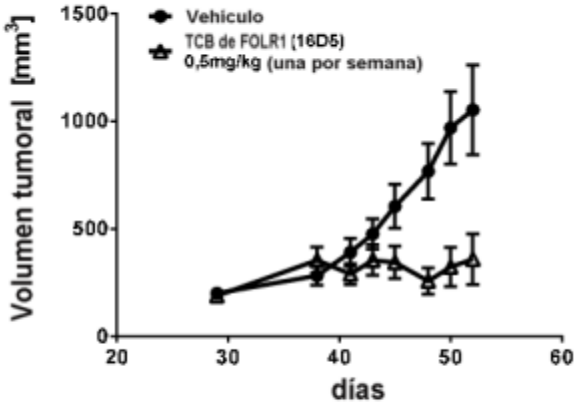


Fig. 40E

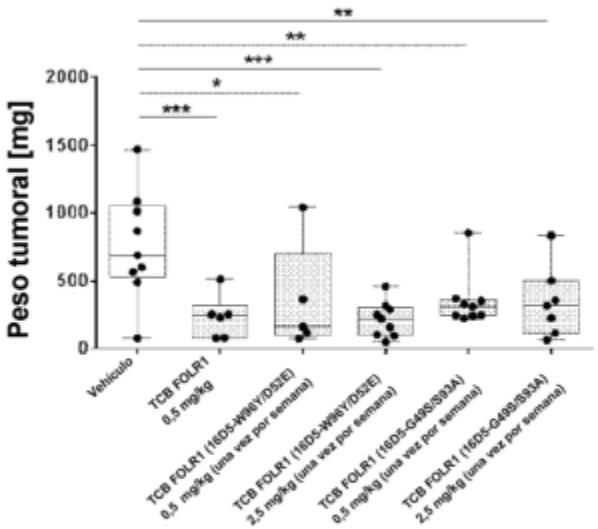


Fig. 40F

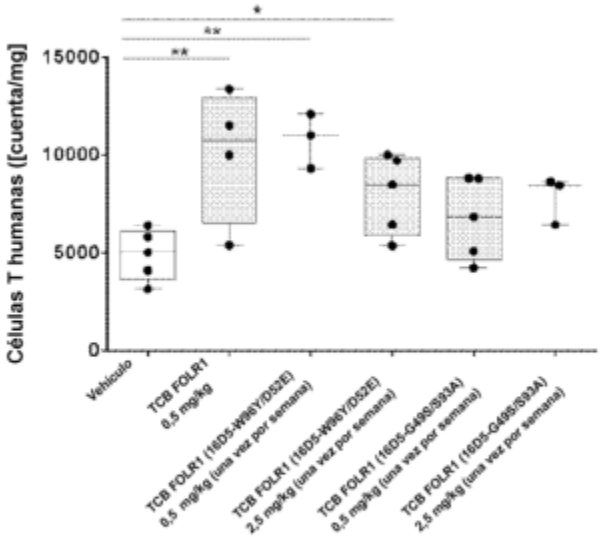


Fig. 40G

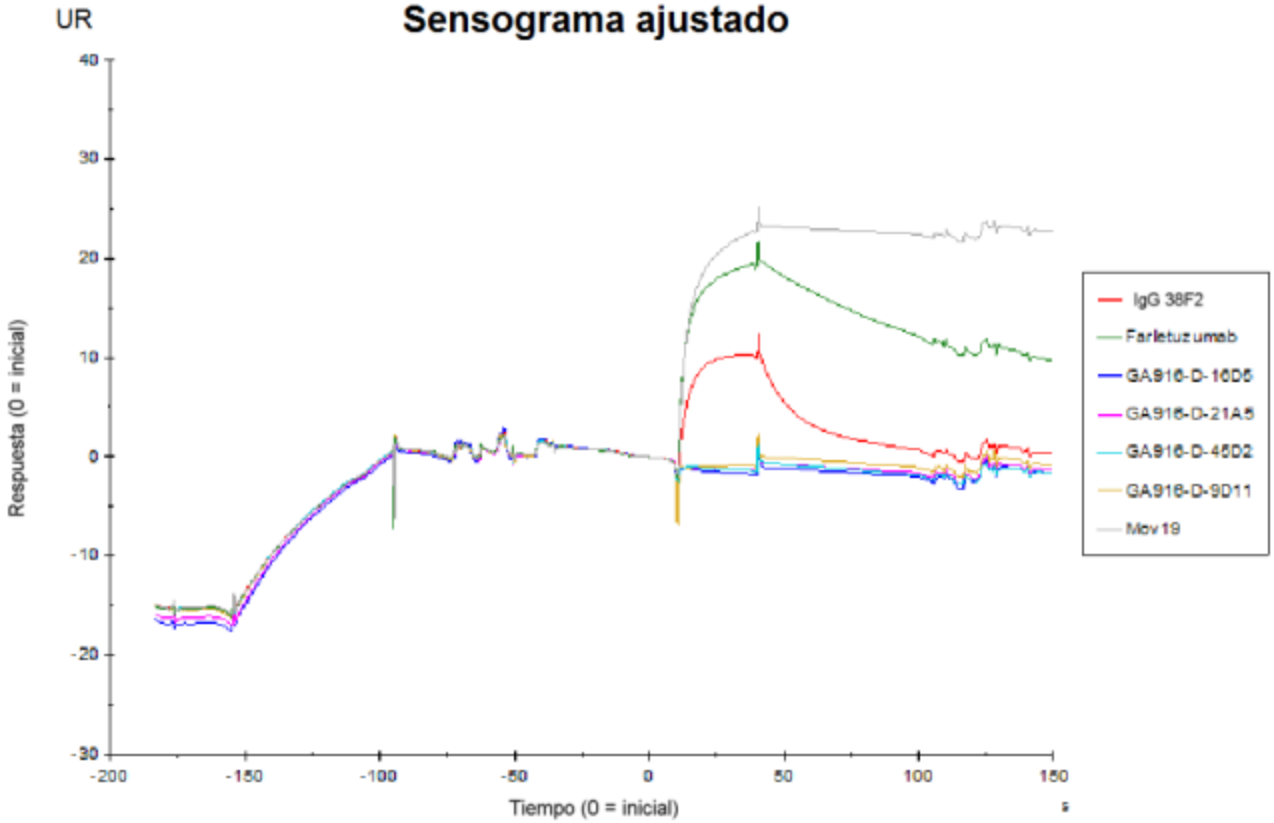

Sensograma ajustado
UR
Respuesta (0 = inicial)
Tiempo (0 = inicial)
s
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-200
-150
-100
-50
0
50
100
150
IgG 38F2
Farletuzumab
GA916-D-16D5
GA916-D-21A5
GA916-D-45D2
GA916-D-9D11
Mov19

Fig. 41

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: PI.-**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "**MOLECULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO BIESPECÍFICAS ACTIVADORAS DE CÉLULAS T QUE SE UNEN A CD3 Y AL RECEPTOR 1 DE FOLATO (FOLR1)**".-Clase **C07K 16/28**.-Expediente número **NC2018/0007204**.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho mediante notificación por fijación en lista el 4 de Septiembre de 2018.

2. Con el fin de dar respuesta al **Oficio No. 10621** emitido por la División de Nuevas Creaciones, a continuación me permito presentar los siguientes comentarios y modificaciones en relación con los requerimientos y objeciones formulados por ese Despacho:

3. **MODIFICACIÓN A LA DESCRIPCIÓN DE LA SOLICITUD OBJETO DE ESTUDIO (EXPEDIENTE DE ACEPTACIÓN NÚMERO NC2018/0007204).**

En primer lugar, el examinador del caso indica que:

"La solicitud divisional presentada el 10 de julio de 2018 mediante radicado NC2018/0007204 no cumple con lo establecido en la Circular Única, puesto que el capítulo descriptivo es esencialmente idéntico al capítulo descriptivo de la solicitud parental, presentada el 29 de marzo de 2017 mediante radicado N° NC2017/0003048."

Con el fin de responder al anterior señalamiento, y de conformidad con los numerales 1.2.2.3.2. y 1.2.2.3.2.1. de la Resolución No. 3719 de 2016, en donde se requiere que la memoria descriptiva de la solicitud divisional esté acorde con la división de la materia realizada, me permito señalar que es deseo del solicitante **modificar la memoria descriptiva de la presente solicitud NC2018/0007204 (solicitud divisional),** de tal forma que la solicitud divisional cuenta ahora con una descripción

modificada de 280 **páginas,** en donde **se ha eliminado toda referencia a los anticuerpos 9D11**, materia que se encuentra cubierta y reclamada en la solicitud parental NC2017/0003048.

Para mayor claridad, se adjuntan dos documentos, un primer documento con la versión originalmente presentada que contiene el control de cambios de las partes del texto eliminadas (las cuales se encuentran ~~tachadas~~) y una versión en limpio que incluye todos los cambios.

Por favor note que también **se eliminó toda referencia** a realizaciones que comprenden:

- segundos y terceros restos de unión a antígenos capaces de unirse al receptor FolR1 con por lo menos una secuencia de aminoácidos CDR de las SEQ ID Nº:8, 56 y 57, y al menos una secuencia CDR de cadena ligera seleccionada entre las SEQ ID Nº: 59, 60 y 65. De esta forma, en la descripción se eliminó: parte del primer párrafo de la página 4, último y primer párrafo de las páginas 46 y 47 respectivamente, último y los tres primeros párrafos de la página 48 y 49 respectivamente y primer párrafo de la página 60.

- un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID Nº: 55 y una cadena liviana variable de SEQ ID Nº:64. Teniendo en cuenta lo mencionado, en la descripción se eliminó: parte del primer párrafo de la página 4, últimos 4 párrafos de la página 47 y últimos 3 párrafos de la página 49.

- todas las secuencias asociadas a los anticuerpos 9D11 y las secuencias SEQ ID Nº: 270, 271, 272 y 273 que codifican moléculas de unión a antígeno. De esta manera, en las páginas 291 a 293 dichas secuencias fueron eliminadas;

Dichas realizaciones mencionadas se refieren a materia que se encuentra cubierta y reclamada en la solicitud parental NC2017/0003048, específicamente en las reivindicaciones 1, 7 a 9 y 17 a 20.

Adicionalmente, me permito mencionar que las figuras y el listado de secuencias, de la solicitud divisional aquí mencionada, han sido modificados para estar acorde con la materia ahora reclamada en el capítulo reivindicatorio modificado.

De acuerdo con las anteriores modificaciones, me permito resaltar que **la descripción modificada de la solicitud divisional NC2018/0007204** refleja la división de materia realizada en el capítulo reivindicatorio de la divisional en cuestión, y

por lo tanto, cumplen a cabalidad con los requerimientos establecidos por la Resolución No. 3719 de 2016 y por el Señor Examinador.

4. De conformidad con lo anterior, anexo al presente memorial por favor encuentren:

- ✓ Copia de las páginas **1 a 304** del texto de la descripción modificado de la presente solicitud divisional, en su versión **con control de cambios**;
- ✓ Copia de las páginas **1 a 280** del texto de la descripción modificado de la presente solicitud divisional, **en su versión en limpio**;
- ✓ Copia de **las figuras modificadas**; y
- ✓ Copia del **listado de secuencias modificado**.

5. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

6. Mi dirección es Calle 72 No. 5-83, Piso 6º, Bogotá D.C., Colombia.

Señor Superintendente,

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO BIESPECÍFICAS ACTIVADORAS DE CÉLULAS T QUE SE UNEN A CD3 Y AL RECEPTOR 1 DE FOLATO (FOLR1)

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha remitido por vía electrónica en formato ASCII y se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 9 de noviembre de 2015, se denomina 32186_SL.txt y tiene 445.570 bytes de tamaño.

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a moléculas de unión a antígeno biespecíficas para activar células T, en particular, a anticuerpos biespecíficos que se dirigen a CD3 y al receptor 1 de folato (FolR1). Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas, y a vectores y células hospedadoras que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a métodos para producir las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención, y a métodos para usar estas moléculas de unión a antígeno biespecíficas en el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes

La destrucción selectiva de una célula individual o de un tipo celular específico a menudo es deseable en una diversidad de situaciones clínicas. Por ejemplo, la destrucción específica de células tumorales es una meta principal de la terapia para el cáncer, a la vez que se dejan las células y tejidos sanos intactos y sin dañar.

Una forma atractiva de lograr eso es mediante la inducción de una respuesta inmunitaria contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunitarias, tales como los linfocitos citolíticos naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL) ataquen y destruyan a células tumorales. Los CTL forman las células efectoras más potentes del sistema inmunitario, aunque no pueden activarse mediante el mecanismo efector mediado por el dominio Fc de los anticuerpos terapéuticos convencionales.

En este sentido, los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un "brazo" a un antígeno de superficie en células diana, y con el segundo "brazo" a un componente activador invariante del complejo de receptor de células T (TCR), ha captado el interés en los últimos años. La unión simultánea de dicho anticuerpo a ambas de sus dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y la célula T, causando la activación de cualquier célula T citotóxica y la posterior lisis de

la célula diana. De este modo, se redirige la respuesta inmunitaria a las células y es independiente de la presentación de antígenos peptídicos por la célula diana o de la especificidad de las células T como pudiera ser relevante para la activación normal restringida al CMH de los CTL. En este contexto es crucial que los CTL solo se activen cuando una célula diana está presentado al anticuerpo biespecífico a estos, es decir, se imita la sinapsis inmunológica. Son particularmente deseables anticuerpos biespecíficos que no requieran de preacondicionamiento o coestimulación de linfocitos para provocar una lisis eficaz de células diana.

FOLR1 se expresa en células tumorales epiteliales de diversos orígenes, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, Se han descrito varias estrategias para dirigirse a FOLR1 con anticuerpos terapéuticos, tales como farletuzumab, conjugados de anticuerpo-fármaco o terapia con células T adoptivas para la obtención de imágenes de tumores (Kandalaft et al., J Transl Med. 3 ago 2012;10:157. doi: 10.1186/1479-5876-10-157; van Dam et al., Nat Med. 18 sep 2011;17(10):1315-9. doi: 10.1038/nm.2472; Cliftonet al., Hum Vaccin. feb 2011;7(2):183-90. Epub 1 Feb 2011; Kelemen et al., Int J Cancer. 15 de jul de 2006;119(2):243-50; Vaitilingam et al., J Nucl Med. jul 2012;53(7); Teng et al., Ago 2012;9(8):901-8. doi: 10.1517/17425247.2012.694863. Epub 5 jun 2012. Se han efectuado algunos intentos para dirigirse a tumores positivos a receptor de folato con construcciones que se dirigen al receptor de folato y a CD3 (Kranz et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 26 de sep, 1995; 92(20): 9057–9061; Roy et al., Adv Drug Deliv Rev. 29 abr 2004;56(8):1219-31; Huiting Cui et al Biol Chem. 17 ago; 2012; 287(34): 28206-28214; Lamers et al., Int. J. Cancer. 60(4):450 (1995); Thompson et al., MAbs. 2009 Jul-Aug;1(4):348-56. Epub 19 jul 2009; Mezzanzanca et al., Int. J. Cancer, 41, 609-615 (1988). Sin embargo, las estrategias abordadas hasta ahora tienen muchas desventajas. Las moléculas usadas hasta ahora no podían producirse de manera fácil y fiable ya que requieren reticulación química. De manera similar, no pueden producirse moléculas híbridas a gran escala como proteínas humanas y requieren el uso de proteínas de rata, murinas u otras que son altamente inmunogénicas cuando se administran a seres humanos y, por lo tanto, tienen un valor terapéutico limitado. Además, muchas de las moléculas existentes retienen la unión a FcgR.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de nuevos anticuerpos biespecíficos mejorados para inmunoterapia dirigida mediada por células T. La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas diseñadas para la activación dirigida de células T, en particular, moléculas de unión a antígeno biespecíficas adecuadas como agentes terapéuticos eficaces y seguros que pueden producirse y dosificarse fácilmente.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34; y

(ii) un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1).

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende un primer resto de unión a antígeno que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende además (iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1. En una realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores, al menos uno del segundo y tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores, comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de manera estable. En algunas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno y el segundo resto de unión a antígeno están conectados cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. En algunas realizaciones, el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, opcionalmente a través de un enlazador peptídico.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende al menos una

secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31. .

En otra realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende al menos una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 50 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende (a) secuencias de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) de SEC ID Nº: 8; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de SEC ID Nº: 9; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de SEC ID Nº: 50; (d) una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) de SEC ID Nº: 52; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de SEC ID Nº: 53, y (f) una secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de SEC ID Nº: 54. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 51.

En otra realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) comprende al menos una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 275 y SEC ID Nº: 315 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende (a) secuencias de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) de SEC ID Nº: 16; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de SEC ID Nº: 275; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de SEC ID Nº: 315; (d) una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) de SEC ID Nº: 32; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de SEC ID Nº: 33, y (f) una secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de SEC ID Nº: 34. En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse de manera específica a

FolR1 comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 de ser humano y a FolR1 de mono cinomolgo. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano, a FolR1 de mono cinomolgo y a FolR1 murino. En una realización, molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano, a FolR1 de cinomolgo y no a FolR1 murino.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada en la que bien las regiones variables o las constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores comprende no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3. En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina. En una realización, el dominio Fc es una inmunoglobulina de clase IgG, específicamente un dominio Fc de IgG_1 o IgG_4. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor, generando de este modo una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que puede posicionarse en una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que puede posicionarse la protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad. En una realización, el dominio Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc y/o la función

efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo. En una realización, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor de Fc activador y/o la función efectora, siendo dichas sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de Kabat). En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ, En una realización, la función efectora es citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la proliferación de células T humanas positivas a CD3 *in vitro*. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células mononucleares de sangre periférica humanas *in vitro*. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro*. En una realización, la célula T es una célula T CD8 positiva. En una realización, la célula tumoral humana que expresa FolR1 es una célula HeLa, Skov-3, HT-29, o HRCEpiC. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 36 pM tras 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 178,4 pM tras 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 134,5 pM o mayor tras 48 horas.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores induce la regulación positiva de la expresión de la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 sobre la célula T según se mide mediante citometría de flujo. En una realización, la célula T es una célula T CD4 positiva o una célula T CD8 positiva. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 5,36 pM a aproximadamente 4 nM. En una realización, la

molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 murino con una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores es específica para FolR1 y no se une a FolR2 o FolR3. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores tiene una afinidad (unión monovalente) de 1 µM o mayor. En una realización, la afinidad es de aproximadamente 1,4 µM para FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores tiene una avidez (unión bivalente) de aproximadamente 1-100 nM o menor. En una realización, la avidez es de aproximadamente 10 nM o menor. En una realización, la avidez es de 10 nM.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a FolR1 expresado en una célula tumoral humana. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a un epítopo conformacional en FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células de cualquiera de las realizaciones anteriores T no se une al receptor de folato 2 humano (FolR2) o al receptor de folato 3 humano (FolR3). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEC ID Nº: 227). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 227, 230 y 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 y 229.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que compite por la unión a FolR1 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 49 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 51; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con

un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que compite por la unión a FolR1 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con un anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3, y un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1), en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en FolR1 humano que un primer anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 49 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 51; y en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en CD3 humano que un segundo anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3, y un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1), en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en FolR1 humano que un primer anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEC ID Nº: 31; y en el que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une al mismo epítopo en CD3 humano que un segundo anticuerpo de referencia que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera (VL) de SEC ID Nº: 31.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de unión a antígeno del mismo que compite por la unión a FolR1 con un anticuerpo que

comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31, en el que la competición por la unión se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, en la que la molécula de unión a antígeno comprende una primera, segunda, tercera, cuarta y quinta cadena polipeptídica que forman un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, en el que el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse a CD3 y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son cada uno capaces de unirse al receptor 1 de folato (FolR1), en el que a) la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden, en dirección de amino (N)-terminal a carboxilo (C)-terminal, VLD1 y CLD1; b) la tercera cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, VLD2 y CH1D2; c) la cuarta cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, VHD1, CH1D1, CH2D1 y CH3D1; d) la quinta cadena polipeptídica comprende VHD1, CH1D1, VHD2, CLD2, CH2D2 y CH3D2; en el que VLD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VLD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, CLD1 es un primer dominio constante de cadena ligera, CLD2 es un segundo dominio constante de cadena ligera, VHD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VHD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, CH1D1 es un primer dominio constante 1 de cadena pesada, CH1D2 es un segundo dominio constante 1 de cadena pesada, CH2D1 es un primer dominio constante 2 de cadena pesada, CH2D2 es un segundo dominio constante 2 de cadena pesada, CH3D1 es un primer dominio constante 3 de cadena pesada, y CH3D2 es un segundo dominio constante 3 de cadena pesada.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, (i) la tercera cadena polipeptídica y VHD2 y CLD2 de la quinta cadena polipeptídica forman el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3; (ii) la primera cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la cuarta cadena polipeptídica forman el segundo resto de unión capaz de unirse a FolR1; y (iii) la segunda cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la quinta cadena polipeptídica forman el tercer resto de unión capaz de unirse a FolR1. En una realización, CH2D1, CH3D1, CH2D2 y CH3D2 forman un dominio Fc de una inmunoglobulina de clase IgG. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En una realización, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización, CH3D2 comprende un resto de aminoácido que tiene un volumen mayor de cadena lateral, que se puede posicionar en una cavidad en CH3D1. En una realización, el dominio Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo. En una

realización, cada subunidad del dominio Fc comprende tres sustituciones de aminoácidos que reducen al menos una de unión a un receptor de Fc activador y función efectora, siendo dichas sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G de acuerdo con la numeración de Kabat. En una realización, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ, En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la proliferación de células T humanas positivas a CD3 *in vitro*. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células mononucleares de sangre periférica humanas *in vitro*. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro*. En una realización similar, la célula tumoral humana que expresa FolR1 es una célula HeLa, Skov-3, HT-29, o HRCEpiC. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación mediada por células T de la célula tumoral que expresa FolR1 *in vitro* con una CE40 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 36 pM después de 24 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 178,4 pM después de 24 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 134,5 pM o mayor después de 48 horas. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la regulación positiva de la expresión de la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 sobre la célula T según se mide mediante citometría de flujo. En una realización similar, la célula T es una célula T CD4 positiva o una célula T CD8 positiva. En una de las realizaciones anteriores, en la que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 5,36 pM a aproximadamente 4 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 murino con

una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 expresado en una célula tumoral humana. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a un epítopo conformacional en FolR1 humano. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T no se une al receptor de folato 2 humano (FolR2) o al receptor de folato 3 humano (FolR3). En una de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEC ID Nº: 227). En una de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 227, 230 y 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 y 229. En una de las realizaciones anteriores, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es una molécula humanizada o quimérica. En una de las realizaciones anteriores, VHD2 y CH1D1 están enlazadas a través de un enlazador peptídico.

En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 86. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la quinta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308. En una de las realizaciones anteriores de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230; la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 86; la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309; y la quinta cadena polipeptídica comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno

biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la realización anterior comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230 y de SEC ID Nº: 86.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 308. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 276. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la realización anterior comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 277 y de SEC ID Nº: 35.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 277. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 276.

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 169. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 246. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 247. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 97. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 198.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 287. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia

nucleotídica de SEC ID Nº: 288. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la secuencia nucleotídica de SEC ID Nº: 289.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado codificado por el polinucleótido de la realización anterior. En otro aspecto, la invención proporciona un vector, particularmente un vector de expresión, que comprende al polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento. En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido o un vector de cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento.

En un aspecto, la invención proporciona un método para producir la molécula de unión a antígeno biespecífico activadora de células T capaz de unirse específicamente a CD3 y a un antígeno de célula diana, que comprende las etapas de a) cultivar la célula hospedadora de las realizaciones anteriores en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T y b) recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T producida mediante el método de la realización anterior.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la invención proporciona la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores o la composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso como medicamento.

En un aspecto, la invención proporciona la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores o la composición farmacéutica de una cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En un aspecto, la invención proporciona el uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores en una forma farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, dicha enfermedad es un cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana que comprende poner en contacto una célula diana con la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de una cualquiera de las realizaciones anteriores en presencia de una célula T.

En un aspecto, la invención proporciona la invención tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-I ilustran configuraciones ejemplares de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T (TCB) de la invención. Todas las construcciones, a excepción del formato kappa-lambda en (Fig. 1I) tienen mutaciones P329G LALA y comprenden fragmentos Fc de pomo en agujero con modificaciones de pomo en agujero. (Fig. 1A) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 invertido (cadena ligera común)”. La molécula de unión a FolR1 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. Estas construcciones no se cruzan y tienen tres veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1 B) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 de cabeza a cola (cadena ligera común)”. Estas construcciones no se cruzan y tienen dos veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1C) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 clásico (cadena ligera común)”. Estas construcciones no se cruzan y tienen dos veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1D) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 clásico (cadena ligera común)”. La molécula de unión a CD3 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. Estas construcciones no se cruzan y tienen tres veces la misma cadena ligera VLCL. (Fig. 1E) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 crossfab clásico”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en vez de la cadena CH1-VH convencional. La molécula de unión a CD3 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. (Fig. 1F) Ilustración de “FolR1 TCB 2+1 crossfab invertido”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en

vez de la cadena CH1-VH convencional. La molécula de unión a FolR1 se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de pomo. (Fig. 1G) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 crossfab cabeza a cola”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en vez de la cadena CH1-VH convencional. (Fig. 1H) Ilustración de “FolR1 TCB 1+1 crossfab clásico”. Estas construcciones comprenden una cadena Ck-VH para la molécula de unión a CD3 en vez de la cadena CH1-VH convencional. La figura 1I ilustra el formato de anticuerpo CD3/FolR1 kappa-lambda. Estas construcciones comprenden una cadena ligera común cruzada VLCH1 y una cadena cruzada VHCL específica para CD3 y una cadena cruzada VHCL específica para FolR1.

Las figuras 2A-C ilustran gráficas que resumen la unión de moléculas de IgG de unión a FoLR1 a células HeLa. La unión de moléculas de unión a FolR1 recientemente generadas a FolR1 expresado en células HeLa se determinó mediante citometría de flujo. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 3A-B ilustran gráficas que resumen la especificidad de las moléculas de unión a FolR1 por FolR1. Se analizó la unión de IgG de FolR1 a células HEK transfectadas de manera transitoria con FolR1 o FolR2 mediante citometría de flujo para identificar clones que se unen específicamente a FolR1 y no a FolR2. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 4A-B ilustran gráficas que resumen la reactividad cruzada de moléculas de unión a FolR1 a cyFoLR1. Se abordó la reactividad cruzada de los anticuerpos de FolR1 a FolR1 de cino en células HEK transfectadas de manera transitoria con cyFolR1 mediante citometría de flujo. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

La figura 5 representa a una gráfica que ilustra la internalización de TCB de FolR1 después de la unión. Se ensayó la unión de los cuatro TCB de FolR1 después de la unión a FolR1 en células HeLa. Los demás TCB de FolR1 sobre la superficie se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente después de los puntos temporales de incubación indicados a 37 °C. Se calculó el porcentaje de internalización.

Las figuras 6A-E ilustran gráficas que resumen la unión de IgG de FolR1 a células con diferentes niveles de expresión de FolR1. La unión de IgG de 16D5 y Mov19 a células tumorales con diferentes niveles de expresión de FolR1 se analizó mediante

citometría de flujo. Se incluyó IgG de DP47 como control de isotipo y se incluyó MKN-45 como línea celular negativa a FolR1. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 7A-L ilustran gráficas que resumen la eliminación de células HT-29 y SKOV3 mediada por células T. Se usaron TCB de FolR1 para ensayar la eliminación de células tumorales HT-29 y SKOV3 mediada por células T y la regulación positiva del marcador de activación en células T tras la eliminación. (Figs. 7A-D) Se midió la eliminación de células HT-29 y SKOV3 mediada por células T en presencia de TCB de FolR1 16D5 por liberación de LDH tras 24 h y 48 h. Se incluyó TCB DP47 como control negativo. Después de 48 h de incubación se evaluó la regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T CD8 y células T CD4 tras la eliminación de células tumorales SKOV3 (Figs. 7E-H) o HT-29 (Fig. 7I-L) mediante citometría de flujo.

La figura 8 ilustra una gráfica que muestra la ausencia de unión de anti-FolR1 a eritrocitos. Los eritrocitos se clasificaron como población positiva a CD235a y la unión de IgG 16D5, IgG Mov19 e IgG DP47 a esta población se determinó mediante citometría de flujo. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-humano marcado fluorescentemente.

Las figuras 9A-D ilustran gráficas que resumen la regulación positiva del marcador de activación en sangre completa. La regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 de células T CD4 y células T CD8 24 h después de la adición de TCB de FolR1 16D5, TCB de FolR1 Mov19 y TCB DP47 se analizó mediante citometría de flujo.

.

Las figuras 12A-X ilustran gráficas que resumen la eliminación mediada por células T de células epiteliales primarias. Se usaron células epiteliales primarias con niveles muy bajos de FolR1 para ensayar la eliminación mediada por células T con TCB 16D4 de FolR1, se incluyó TCB de DP47 como control negativo y se incluyeron células HT29 como control positivo. (Figs. 12A-H) la liberación de LDH de células de pigmento retinal humano (HRP), corticales renales humanas (HRC), bronquiales humanas (HB) y HT29 se determinó tras 24 y 48 h. La regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T CD4 y células T CD8 tras la eliminación de (Figs. 12I-L) HRP, (Figs. 12M-P) HRC, (Figs. 12Q-T) HB y (Figs. 12 U-X) HT29 se determinó tras 48 h mediante citometría de flujo.

Las figuras 13A-C muestran una comparación de diferentes formatos de TCB con

16D5. Se comparó en cuatro formatos diferentes de TCB que contenían la molécula de unión a FolR1 16D5 en la Fig. 13A la unión a células HeLa, en la Fig, 13B la eliminación mediada por células T de células SKOV3 tras 24 h y 48 h y en la Fig. 13C la regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T CD4 y células T CD8 48 h después de la eliminación.

La figura 15 ilustra un perfil FC de TCB de FolR1 en ratones NOG para tres dosis diferentes.

La figura 16 ilustra un protocolo experimental para el estudio de la eficacia con TCB de FolR1.

Las figuras 17A-B ilustran curvas de crecimiento tumoral. (Fig. 17A) Valores medios y EEM de volúmenes tumorales en los diferentes grupos de tratamiento. (Fig. 17B) Crecimiento tumoral de ratones individuales en todos los grupos de tratamiento. La ICT (inhibición del crecimiento tumoral) proporciona el porcentaje del volumen tumoral medio en comparación con el grupo de vehículo.

La figura 18 muestra los pesos tumorales a la finalización del estudio.

Las figuras 19A-B muestran análisis FACS de células T que se infiltran en tumores en el día 32. (Fig. 19A) Las suspensiones de células tumorales individuales se tiñeron con anti-CD3/CD4/CD8 humano y se analizaron mediante citometría de flujo. (Fig. 19B) Valores medios y EEM de los recuentos de células T por mg de tejido tumoral en diferentes grupos de tratamiento.

Las figuras 20A-B muestran análisis FACS para la activación de células T/desgranulación y secreción de citocinas en el día 32 del estudio. Se tiñeron células T CD4+ (Fig. 20A) y CD8+ (Fig. 20B) que se infiltran en tumores para citocinas, activación y marcadores de desgranulación. Se muestran los valores medios y EEM de los recuentos de células T por mg de tejido tumoral en diferentes grupos de tratamiento.

Las figuras 21A-B muestran el porcentaje de lisis tumoral. Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Tras 24 h (Fig. 21A) y 48 h (Fig. 21B) se determinó la eliminación de células tumorales midiendo la liberación de LDH.

Las figuras 22A-D muestran la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD4. Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Después de 48 h, se midió la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD4 (Fig. 22A-B) y en células T CD8 (Fig. 22C-D) mediante

citometría de flujo.

Las figuras 23A-B muestran el porcentaje de lisis tumoral. Eliminación mediada por células T de células SKOV-3 (FolR1 medio) inducida por TBC 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5 tras 24 h (Fig. 23A) y 48 h (Fig. 23B) de incubación (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras).

Las figuras 24A-C muestran la eliminación por células T inducida por TCB 36F2, TCB 16D5, TCB 16D5 clásico, TCB 16D5 1+1 y TCB 16D5 HT de células tumorales humanas Hela (FolR1 elevado) (Fig. 24A), Skov-3 (FolR1 medio) (Fig. 24B) y HT-29 (FolR1 bajo) (Fig. 24C) (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras, tiempo de incubación 24 h). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión.

Las figuras 25A-C muestran la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD8+ (Fig. 25A, B) y CD4+ (Fig. 25C), después de la eliminación mediada por células T de células HeLa (FolR1 alto) (Fig. 25A), células Skov-3 (FolR1 medio) (Fig. 25 B) y células HT-29 (FolR1 bajo) (Fig. 25C) (E:T = 10:1, 48 h de incubación) inducida por TCB 36F2, TCB 16D5 y TCB DP47 (control sin unión).

Las figuras 26A-F muestran la eliminación por células T inducida por TCB 36F2, TCB 16D5 y TCB DP47 de células epiteliales corticales renales (Fig. 26A, B), células epiteliales pigmentarias retinales humanas (Fig. 26C, D) y células HT-29 (Fig. 26E, F) tras 24h (Fig. 26A, C, E) y 48 h (Fig. 26B, D, F) de incubación (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras).

La figura 27 ilustra una tabla que resume la cuantificación de los sitios de unión a FolR1 en varias líneas celulares normales y de cáncer.

Las figuras 28A-B muestran la unión de TCB 16D5 y sus correspondientes variantes de desamidación de CD3, TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA a CD3 humano expresado en células Jurkat.

Las figuras 29A-B muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas SKov-3 (FolR1 medio) inducida por TCB 16D5 y sus correspondientes variantes de desamidación de CD3, TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA (Fig. 29A) (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras, tiempo de incubación 24 h). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión.

Las figuras 30A-B muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas HT-29 (FolR1 bajo) inducida por TCB 16D5 y sus correspondientes

variantes de desamidación de CD3, TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA (Fig. 30 A) (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras, tiempo de incubación 24 h). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión.

Las figuras 31A-C muestran la intensidad media de fluorescencia y la lisis de células tumorales.

Las figuras 32A-E muestran la unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HeLa.

La figura 33 muestra la unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y las dos variantes de afinidad reducida de 16D5, TCB 16D5 W96Y/D52E y TCB 16D5 G49S/S93A a FolR1 en células HeLa.

Las figuras 34A-E muestran la unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HT-29.

Las figuras 35A-D muestran la unión de moléculas de unión intermedia a FolR1 (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), TCB 16D5 y TCB 36F2 a células HEK293T que expresan FolR1 o FolR2 de ser humano o de ratón.

Las figuras 36A-F muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas HeLa (alta expresión de FolR1), SKov-3 (expresión media de FolR1) y HT-29 (baja expresión de FolR1) inducida por moléculas de unión intermedia a FolR1 (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), TCB 16D5 y TCB 36F2 tras 24 h (A-C) y 48 h (D-F) de incubación. Se usaron PBMC humanos como células efectoras (E:T = 10:1).

Las figuras 37A-F muestran la eliminación por células T de células tumorales humanas HeLa (alta expresión de FolR1), SKov-3 (expresión media de FolR1) y HT-29 (baja expresión de FolR1) inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5-G49S/K53A, TCB 16D5 W96Y, TCB 16D5 W96Y/D52E), TCB 16D5 y TCB 36F2 tras 24 h (Fig 38A-C) y 48 h (Fig. 38D-F) de incubación. Se usaron PBMC humanos como células efectoras (E:T = 10:1).

Las figuras 38A-F muestran la eliminación por células T de células primarias humanas de epitelio pigmentario retinal y de epitelio cortical renal inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E), TCB 16D5, TCB 36F2 y la molécula de unión intermedia a FolR1,

TCB 14B1 evaluada tras 24 h (Fig.39A-C) y 48 h (Fig.39D-F) de incubación (E:T = 10:1, PBMC humanas efectoras). Se incluyeron células HT-29 (baja expresión de FolR1) como línea celular de control y TCB DP47 sirvió como control sin unión.

Las figuras 39A muestra la FC de una sola dosis de construcciones de TCB de FOLR1 en ratones NOG hembra.

Las figuras 40A-G muestran la eficacia *in vivo* de construcciones de TCB de FOLR1 (16D5, 16D5 G49S/S93A y 16D5 W96Y/D52E) tras la transferencia de PBMC humanos en ratones NOG portadores de HeLa.

La figura 41 muestra que Farletuzumab (verde oscuro, segundo desde arriba) y Mov19 (gris, superior) son capaces de unirse a huFolR1 que se captura en 16D5, demostrando que las moléculas de unión de la serie 16D5 reconoce un epítopo distinto del reconocido por Farletuzumab o Mov19.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos se usan en el presente documento tal como se usan generalmente en la técnica, a menos que se defina lo contrario a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos de los mismos.

El término "biespecífico" significa que la molécula de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende al menos dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica es capaz de unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, particularmente a dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

El término "valente" tal como se usa en el presente documento indica la presencia de un número específico de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. Como tales, la expresión "unión monovalente a un antígeno" indica la presencia de un sitio de unión a antígeno (y a no más de uno) específico para el

antígeno en la molécula de unión a antígeno.

Un "sitio de unión a antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más restos de aminoácidos, de una molécula de unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende restos de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina nativa tiene típicamente dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab tiene típicamente un solo sitio de unión a antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "resto de unión a antígeno" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, un resto de unión a antígeno es capaz de dirigir a la entidad a la que se une (por ejemplo, un segundo resto de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico. En otra realización, un resto de unión a antígeno es capaz de activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno de complejo de receptor de célula T. Los restos de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos tal como se definen adicionalmente en el presente documento. Los restos de unión a antígeno particulares incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo tal como se definen adicionalmente en el presente documento y como se conocen en la técnica. Las regiones constantes de cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α, δ, ε, γ, o μ. Las regiones constantes de cadena ligera útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "determinante antigénico" es sinónima con "antígeno" y "epítopo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un conjunto de aminoácidos contiguos o una configuración conformacional compuesta de diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo resto de unión a antígeno-antígeno. Los determinantes antigénicos útiles pueden encontrarse, por ejemplo, sobre las superficies de células tumorales, sobre las superficies de células infectadas por virus, sobre las superficies de células enfermas, sobre las superficies de células inmunitarias, libres en el suero sanguíneo, y/o en la matriz extracelular (ME). Las proteínas citadas como antígenos en el presente documento, por ejemplo, FolR1 y CD3, pueden ser cualquier forma nativa de proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a

menos que se indique lo contrario. En una realización particular, el antígeno es una proteína humana. En los casos donde se hace referencia en el presente documento a una proteína específica, el término abarca la proteína de "longitud completa" no procesada así como cualquier forma de la proteína que sea el resultado de su procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de la proteína, por ejemplo, variantes de corte y empalme alternativo o variantes alélicas. Las proteínas humanas ejemplares útiles como antígenos incluyen, pero sin limitación: FolR1 (receptor alfa de folato (FRA); proteína de unión a folato (FBP); FolR1 humana, n.º de UniProt: P15328; FolR1 murina, n.º de UniProt: P35846; FolR1 de cinomolgo, n.º de UniProt: G7PR14) y CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase en n.º de UniProt P07766 (versión 130), n.º RefSeq del NCBI NP:000724.1, SEC ID Nº: 150 para la secuencia humana; o el n.º de UniProt Q95LI5 (versión 49), n.º GenBank del NCBI BAB71849.1, para la secuencia de cinomolgo [*Macaca fascicularis*]). La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención se une a un epítopo de CD3 o a un antígeno de célula diana que está conservado entre las CD3 o antígenos diana de diferentes especies. En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención se une a CD3 y a FolR1, pero no se une a FolR2 (receptor beta de folato; FRB; FolR2 humana, n.º de UniProt: P14207) o a FolR3 (receptor gamma de folato; FolR3 humana, n.º de UniProt: P41439).

Por "unión específica" se pretende indicar que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un resto de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico puede medirse bien mediante un ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), y los ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En una realización, el alcance de la unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es menos de aproximadamente el 10 % de la unión del resto de unión a antígeno medida, por ejemplo, mediante SPR. En determinadas realizaciones, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión a antígeno que comprende ese resto de unión a antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de ≤ 1 µM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM, o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menor, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Afinidad" 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 receptor) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique lo contrario, tal como se

usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (por ejemplo, un resto de unión a antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{off} y k_{on}, respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la relación de las constantes de velocidad siga siendo la misma. La afinidad puede medirse mediante métodos bien establecidos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Un método particular para medir la afinidad es resonancia de plasmón superficial (SPR).

La "unión reducida", por ejemplo, la unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, medida, por ejemplo, mediante SPR. Por claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad a cero (o por debajo del límite de detección del método analítico), es decir, la eliminación completa de la interacción. Por el contrario, la "unión aumentada" se refiere a un aumento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

La "activación de células T", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, en particular de un linfocito T citotóxico, seleccionada entre: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica, y expresión de marcadores de activación. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención son capaces de inducir la activación de células T. Los ensayos adecuados para medir la activación de células T se conocen en la técnica descrita en el presente documento.

Un "antígeno de célula diana", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico presentado sobre la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor, tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral. En particular, "antígeno de célula diana" se refiere al receptor 1 de folato.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "primero" y "segundo" con respecto a restos de unión a antígeno etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir un orden u orientación específica de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a menos que esto se afirme expresamente.

Una "molécula de Fab" se refiere a una proteína que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y el dominio VL y VL de la cadena ligera (la "cadena ligera de Fab") de una inmunoglobulina.

La expresión "moléculas de Fab que tienen cadenas ligeras VLCL idénticas", tal

como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de unión que comparten una cadena ligera pero que siguen teniendo especificidades separadas, por ejemplo, pueden unirse a CD3 o a FolR1. En algunas realizaciones, las moléculas biespecíficas activadoras de células T comprenden al menos dos moléculas de Fab que tienen cadenas ligeras VLCL idénticas. Las cadenas pesadas correspondientes se remodelan y confieren unión específica al antígeno biespecífico CD3 activador de células T y al antígeno de célula diana FolR1, respectivamente.

Por "fusionado" se entiende que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad de dominio Fc) están unidos mediante enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más enlazadores peptídicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "monocatenario" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente por enlaces peptídicos. En determinadas realizaciones, uno de los restos de unión a antígeno puede ser una molécula de Fab monocatenaria, es decir, una molécula de Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están conectadas mediante un enlazador peptídico para formar una sola cadena polipeptídica. En una realización particular similar, se conecta el extremo C-terminal de la cadena ligera de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab en la molécula de Fab monocatenaria.

Se entiende que una molécula Fab "sobrecruzada" (también denominada "Crossfab") es una molécula Fab en la que bien las regiones variables o las regiones constantes de la cadena ligera y pesada de Fab están intercambiadas, es decir, la molécula de Fab sobrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena ligera y de la región constante de cadena pesada, y una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena pesada y de la región constante de cadena ligera. Por claridad, en una molécula Fab sobrecruzada en la que las regiones variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están intercambiadas, la cadena peptídica que comprende la región constante de cadena pesada se cita en el presente documento como la "cadena pesada" de la molécula Fab sobrecruzada. Por el contrario, en una molécula Fab sobrecruzada en la que las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están intercambiadas, la cadena peptídica que comprende la región variable de cadena pesada se cita en el presente documento como la "cadena pesada" de la molécula Fab sobrecruzada. Un anticuerpo que comprende una o más CrossFab se cita en el presente documento como "CrossMab".

En contraste con esto, se entiende que una molécula Fab "convencional" es una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta de las regiones variables y constantes de cadena pesada (VH-CH1), y una cadena ligera compuesta de las regiones variables y constantes de la cadena

ligera (VL-CL).

La expresión "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo de origen natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase de IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que están unidas por enlaces disulfuro. De N- a C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamado dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3), también llamado región constante de cadena pesada. De manera similar, de N- a C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominado dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio constante de cadena ligera (CL), también llamado región constante de cadena ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), o μ (IgM), algunos de los cuales pueden dividirse adicionalmente en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG_1), γ_2 (IgG_2), γ_3 (IgG_3), γ_4 (IgG_4), α_1 (IgA_1) y α_2 (IgA_2). La cadena ligera de una inmunoglobulina puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, unidos a través de la región bisagra de la inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca varas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación a Fv, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv), y anticuerpos de un solo dominio. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.571.894 y 5.587.458. Para la discusión de fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden restos de epítopo de unión a receptor salvajes y que tienen semivida in vivo aumentada, véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse,

por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nº 6.248.516 B1). Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante varias técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), tal como se describe en el presente documento.

La expresión "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a una parte o a la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt et al., Kuby Immunology, 6ª Ed, W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o forman las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo estas últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o están implicadas en el reconocimiento de antígenos. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se citan como "regiones

determinantes de la complementariedad" (CDR), y estos términos se usan de manera intercambiable en el presente documento en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región particular se ha descrito por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) y por Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende encontrarse dentro del alcance del término tal como se define y usa en el presente documento. Los restos de aminoácidos adecuados que abarcan las CDR tal como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen en la Tabla 1 a modo de comparación. El número exacto de restos que abarca una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de manera rutinaria qué restos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA A. Definiciones de CDR[1]

CDR	**Kabat**	**Chothia**	**AbM[2]**
CDR1 de V_H	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V_H	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V_H	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V_L	24-34	26-32	24-34
CDR2 de V_L	50-56	50-52	50-56
CDR3 de V_L	89-97	91-96	89-97

[1] La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla A es de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat et al. (véase más adelante).

[2] "AbM" con una “b” minúscula, tal como se usa en la Tabla A se refiere a las CDR tal como se definen por el programa de modelado de anticuerpos de Oxford Molecular's, "AbM".

Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para las secuencias de la región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto habitual en la materia puede asignar de manera unívoca este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de región variable, sin basarse en cualquier dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Tal como se usa en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat et

al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones de restos de aminoácidos específicas en una región variable de anticuerpo son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Las secuencias polipeptídicas del ligado de secuencia no se numeran según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, se encuentra dentro de las capacidades del experto en la materia la conversión de la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

"Marco conservada" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La región FR de un dominio variable consiste de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseída por su cadena pesada. Hay cuatro clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, e IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente.

La expresión "dominio Fc" o "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar, normalmente se define que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Una "subunidad" de un dominio Fc, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el domino Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de auto asociarse establemente. Por ejemplo, una subunidad de un domino Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG y un dominio constante CH3 de IgG.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad

del dominio Fc" es una manipulación de la estructura peptídica o las modificaciones postraduccionales de una subunidad de dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad de dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación que promueve la asociación, tal como se usa en el presente documento, incluye particularmente modificaciones separadas efectuadas a cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desea que se asocien (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), siendo las modificaciones complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades de dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas de las subunidades de dominio Fc para hacer que su asociación se estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por lo tanto, la (hetero)dimerización sucede entre un polipéptido que comprende la primera subunidad de dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad de dominio Fc, que pueden no ser idénticas en el sentido que los componentes fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son iguales. En algunas realizaciones, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácidos en el dominio Fc, específicamente una sustitución de aminoácidos. En una realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácidos separada, específicamente una sustitución de aminoácidos, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión a receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos, regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B), y activación de células B.

Tal como se usa en el presente documento, se considera que los términos "diseñar, diseñado, diseño", incluyen cualquier manipulación de la estructura peptídica o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido de origen natural o recombinante o un fragmento del mismo. El diseño incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación, o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estas estrategias.

La expresión "mutación de aminoácido", tal como se usa en el presente documento pretende abarcar sustituciones, eliminaciones, inserciones, y modificaciones de aminoácidos. Cualquier combinación de sustitución, eliminación inserción, y

modificación se efectúa para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc, o una asociación aumentada con otro péptido. Las eliminaciones e inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen eliminaciones e inserciones en amino y/o carboxilo terminal de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos son mutaciones particulares de aminoácidos. Con el fin de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, se prefieren particularmente las sustituciones de aminoácidos no conservativas, es decir, reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones de aminoácidos incluyen el reemplazo con aminoácidos de origen no natural o con derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Las mutaciones de aminoácidos pueden generarse usando métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis de sitio dirigido, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que los métodos para alterar el grupo de cadena lateral de un aminoácido mediante métodos distintos a ingeniería genética, tales como modificación química, también puedan ser útiles. Pueden usarse varias designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación de aminoácidos. Por ejemplo, una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina puede indicarse como 329G, G329, G_{329}, P329G, o Pro329Gly.

Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) enlazados linealmente mediante enlaces de amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido" y el término "polipéptido puede usarse en lugar de, o de manera intercambiable con cualquiera de estos términos. También se entiende que el término "polipéptido" se refiere a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, o modificación mediante aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido puede proceder de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier modo, incluyendo mediante síntesis química. Un polipéptido de la invención puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más,

50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se citan como plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se citan como no plegados.

Por un polipéptido "aislado" o una variante o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se necesita un nivel particular de purificación. Por ejemplo, puede retirarse un polipéptido aislado de su ambiente nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células hospedadoras se consideran aislados para los fines de la invención, como lo son polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada.

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" respecto de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir los espacios en blanco, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc., y el código fuente, junto con las instrucciones para su uso, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el Nº de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V 4.0 D digital. Todos los

parámetros de comparación de secuencias se ajustan por el programa ALIGN-2 y no varían. En las situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de restos de aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que en los casos donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A para B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B para A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN de procedencia viral, o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN). La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su ambiente natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante contenido en un vector que codifica un polipéptido se considera aislado para los fines de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que normalmente contienen a la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente extracromosomalmente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas de

hebra positiva y negativa, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención comprenden además dichas moléculas producidas de manera sintética. Además, un polinucleótido o ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión a ribosomas, o un terminador de la transcripción.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, "idéntica" en un 95 % a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia del nucleótido de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse por otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden suceder en las posiciones terminales 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como asunto práctico, si una secuencia de polinucleótidos particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica con una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede determinarse de manera convencional usando programas informáticos conocidos, tales como los discutidos anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

La expresión "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácidos nucleicos especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinadas realizaciones, el casete de expresión de la invención comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

El término "vector" o la expresión "vector de expresión" son sinónimos de la expresión "construcción de expresión" y se refieren a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de

manera operativa en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. El vector de expresión permite la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por la maquinaria de transcripción y/o traducción celular. En una realización, el vector de la expresión comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención o fragmentos de las mismas.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora" y "cultivo de células hospedadoras" se usan de manera intercambiable y se refiere a células en las cuales se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la progenie derivada de esta independientemente del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. Se incluye en el presente documento la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o seleccionada en la célula transformada originalmente. Una célula hospedadora es cualquier tipo de sistema celular que pueda usarse para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células YO de mieloma, células P3X63 de mieloma de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto, y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal.

Un "receptor Fc activador" es un receptor Fc que después de la ocupación por un dominio Fc de un anticuerpo provoca eventos de señalización que estimulan a células portadoras de receptores para llevar a cabo las funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), y FcαRI (CD89).

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis por células efectoras inmunitarias de las células diana recubiertas de anticuerpo. Las células diana son células a las que los anticuerpos o los derivados de las mismas que comprenden una región Fc se unen específicamente, generalmente a través de la parte de la proteína que está en

N-terminal con la región Fc. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ADCC reducida" se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo en el medio que rodea a las células diana, mediante el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea a las células diana, necesaria para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, mediante el mecanismo de ADCC. La reducción en la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células hospedadoras, usando los mismos métodos convencionales de producción, purificación, formulación y almacenamiento (que son conocidos para los expertos en la materia), pero que no se ha modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, la reducción en la ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácidos que reduce la ADCC, es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución de aminoácido en el dominio Fc. Se conocen bien en la materia ensayos para medir la ADCC (véase, por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO 2006/082515 o la Publicación PCT n.º WO 2012/130831).

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al cual se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene los efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros, y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos como monos), conejos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en esta sea efectivo, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural una enfermedad en el individuo que

se esté tratando, y se puede realizar tanto como profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de síntomas, la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de evolución de la enfermedad, la mejora o alivio de la patología, y la remisión o un pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "antagonista" se usa en su sentido más amplio, e incluye a cualquier molécula que bloquee, inhiba, o neutralice parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgada en el presente documento. De manera similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que induzca una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en el presente documento. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpo, incluyendo fragmentos de anticuerpo modificados por ingeniería genética, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto el polipéptido con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido.

El término “prospecto” se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

Todas las referencias, publicaciones, patentes y solicitudes de patente divulgadas en el presente documento se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

Descripción detallada de las realizaciones

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención es biespecífica, es decir, comprende al menos dos restos de unión a antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos, es decir, a CD3 y a FolR1. De acuerdo con la invención, los restos de unión a antígeno

son moléculas Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos de una cadena pesada y una ligera, cada una comprendiendo una región variable y una constante). En una realización, dichas moléculas Fab son humanas. En otra realización, dichas moléculas Fab están humanizadas. En otra realización más, dichas moléculas Fab comprenden regiones constantes de cadena pesada y ligera humana.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención es capaz de unirse simultáneamente al antígeno de FolR1 y a CD3 de la célula diana. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es capaz de reticular a una célula T y a una célula diana que expresa FolR1 mediante la unión simultánea al antígeno de FolR1 y a CD3 de la célula diana. En una realización aún más particular, dicha unión simultánea da como resultado la lisis de la célula diana que expresa FolR1, en particular, una célula tumoral que expresa FolR1. En una realización, dicha unión simultánea da como resultado la activación de las células T. En otras realizaciones, dicha unión simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, en particular de un linfocito T citotóxico, seleccionada entre el grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica, y expresión de marcadores de activación. En una realización, la unión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a CD3 sin unión simultánea al antígeno de FolR1 de la célula diana no da como resultado la activación de las células T.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es capaz de redirigir la actividad citotóxica de una célula T a una célula diana que expresa FolR1. En una realización particular, dicha redirección es independiente de la presentación de péptidos antigénicos mediada por el CMH por la célula diana y/o de la especificidad de la célula T.

En particular, una célula T de acuerdo con algunas de las realizaciones de la invención es una célula T citotóxica. En algunas realizaciones, la célula T es una célula T $CD4^+$ o $CD8^+$, en particular una célula T $CD8^+$.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3 (también citado en el presente documento como un "resto de unión a antígeno de CD3" o "primer resto de unión a antígeno"). En una realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T proporciona unión monovalente a CD3. En una realización particular, CD3 es CD3 humano o CD3 de cinomolgo, más particularmente CD3 humano. En una realización particular, el resto

de unión a antígeno de CD3 tiene reactividad cruzada (es decir, se une específicamente a) para CD3 humano y de cinomolgo. En algunas realizaciones, el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a la subunidad épsilon de CD3 (véase en n.º de UniProt P07766 (versión 130), n.º RefSeq del NCBI NP:000724.1, SEC ID Nº: 150 para la secuencia humana; n.º de UniProt Q95LI5 (versión 49), n.º GenBank del NCBI BAB71849.1, para la secuencia de cinomolgo [*Macaca fascicularis*]).

En algunas realizaciones, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

En una realización, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

En una realización, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEC ID Nº: 31.

EN una realización, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención comprende al menos un resto de unión a antígeno capaz de unirse al antígeno de FolR1 de la célula diana (también citado en el presente documento como "resto de unión a FolR1" o "segundo" o "tercer" resto de unión a antígeno). En una realización, el resto de unión a antígeno capaz de unirse al antígeno de FolR1 de la célula diana no se une a FolR2 o FolR3. En una realización particular, el resto de unión a antígeno de FolR1 tiene reactividad cruzada (es decir, se une específicamente a) para FolR1 humano y de cinomolgo. En determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende dos restos de unión a antígeno capaces de unirse al antígeno de FolR1 de la célula diana. En una realización particular similar, cada uno de estos restos de unión a antígeno se une específicamente al mismo determinante antigénico. En una realización aún más particular, todos estos restos de unión a antígeno son idénticos. En una realización,

la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende no más de dos restos de unión a antígeno capaces de unirse a FolR1.

El resto de unión a FolR1 es generalmente una molécula Fab que se une específicamente a FolR1 y es capaz de dirigir a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a la que se conecta a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo de célula tumoral específico que expresa FolR1.

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34; y

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1).

En una realización, el primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores comprende además un dominio Fc compuesto de al menos una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable.

En una realización, el primer resto de unión a antígeno y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, opcionalmente a través de un enlazador peptídico.

En una realización particular adicional, hay presente no más de un resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (es decir, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T proporciona unión monovalente a CD3).

Molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T con una cadena ligera común

Los inventores de la presente invención generaron un anticuerpo biespecífico en el que los restos de unión comparten una cadena ligera común que mantiene la especificidad y eficacia del anticuerpo monoespecífico progenitor para CD3 y que puede unirse a un segundo antígeno (por ejemplo, FolR1) usando la misma cadena ligera. La generación de una molécula biespecífica con una cadena ligera común que retiene las propiedades de unión del anticuerpo progenitor no es directa ya que las CDR comunes de la cadena ligera híbrida tienen que efectuar la especificidad de unión para ambas dianas. En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un primer y un segundo resto de unión a antígeno, uno de los cuales es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 y el otro es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a FolR1, en la que la primera y la segunda molécula Fab tienen cadenas ligeras VLCL idénticas. En una realización, dicha cadena ligera idéntica (VLCL) comprende las CDR de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34. En una realización, dicha cadena ligera idéntica (VLCL) comprende a la SEC ID Nº: 35.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo

que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 16, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 17, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 18, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 275 y SEC ID Nº: 315 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33,

SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39, y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 275 y SEC ID Nº: 315, y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, y SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 274 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

En una realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 15 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31 o variantes de las mismas que mantengan funcionalidad.
En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 15, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno (que es una molécula Fab) capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC

ID Nº: 34.
(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 16, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 17, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 18, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a moléculas biespecíficas en las que la menos dos restos de unión a antígeno tienen cadenas ligeras idénticas y cadenas pesadas remodeladas correspondientes que confieren la unión específica al antígeno CD3 activador de células T y al antígeno FolR1 de la célula diana, respectivamente. El uso de este principio denominado "cadena ligera común", es

decir, combinar dos restos de unión que comparten una cadena ligera pero que aún tienen especificidades separadas, previene el mal emparejamiento de la cadena ligera. Por lo tanto, hay menos productos secundarios durante la producción, lo que facilita la preparación homogénea de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T.

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se ilustran en las figuras 1A-I y se describen adicionalmente a continuación.

En algunas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociación estable. Más adelante se describen realizaciones ejemplares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc.

Molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T con con un fragmento Fab sobrecruzado

Los inventores de la presente invención generaron un segundo formato de anticuerpo biespecífico en el que uno de los restos de unión a antígeno es un fragmento Fab sobrecruzado. En un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo biespecífico monovalente, en el que uno de los fragmentos Fab de una molécula de IgG se reemplaza por un fragmento Fab sobrecruzado. Los fragmentos Fab sobrecruzados son fragmentos Fab en los que bien las regiones variables o las regiones constantes de la cadena ligera y pesada están intercambiadas. Los formatos de anticuerpo biespecífico que comprenden fragmentos Fab sobrecruzados se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO2009080252, WO2009080253, WO2009080251, WO2009080254, WO2010/136172, WO2010/145792 y WO2013/026831. En una realización particular, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada en la que bien las regiones variables o las constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas. Dicha modificación previene el mal emparejamiento de las cadenas pesadas y ligeras de diferentes moléculas Fab, mejorando de este modo el rendimiento y pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en producción recombinante. En una molécula Fab sobrecruzada particular útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención, las regiones variables de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas. En otra molécula Fab

sobrecruzada útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención, las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab están intercambiadas.

En una realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 55 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 64 o variantes de las mismas que mantengan funcionalidad.
En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 55, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 64.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 50 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.
En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.
(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:

51.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.

En una realización adicional, el resto de unión a antígeno que es específico para FolR1 comprende una región variable de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de SEC ID Nº: 49 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 51 o variantes de las mismas que mantengan funcionalidad.
En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 36, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 31, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 49, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEC ID Nº: 51.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende adicionalmente

(iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1.

En una realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En una realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab sobrecruzada.

En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de

células T comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3, que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34;
(ii) un segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 49 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54.

(iii) un tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 50 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 52, SEC ID Nº: 53, SEC ID Nº: 54.

En una realización similar, el resto de unión a antígeno de CD3 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y el resto de unión a antígeno de FolR1 comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno y el tercer resto de unión a antígeno son ambos una molécula Fab convencional.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende
(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a CD3 que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 36 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31.

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 51.

(iii) un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente al receptor 1 de folato (FolR1) que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 49 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 51.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno y el tercer resto de unión a antígeno son ambos una molécula Fab convencional.
Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a moléculas biespecíficas en las que dos restos de unión a antígeno confieren unión específica a FolR1 y un resto de unión a antígeno confiere especificidad para el antígeno CD3 activador de células T. Una de las cadenas pesadas se modifica para asegurar un emparejamiento adecuado de las cadenas ligera y pesada, eliminando de este modo la necesidad de una estrategia de cadena ligera común. La presencia de dos sitios de unión a FolR1 permite un acoplamiento adecuado con el antígeno de FolR1 diana y la activación de células T.
Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se ilustran en las figuras 1A-I y se describen adicionalmente a continuación.

En algunas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociación estable. Más adelante se describen realizaciones ejemplares de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc.

Formatos de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T

Tal como se ilustra anteriormente en las figuras 1A-I, en una realización, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T comprenden al menos dos fragmentos Fab que tienen cadenas ligeras idénticas (VLCL) y que tienen cadenas pesadas diferentes (VHCL) que confieren las especificidades para dos antígenos diferentes, es decir, un fragmento Fab es capaz de unirse

específicamente a un antígeno de CD3 activador de células T y el otro fragmento Fab es capaz de unirse específicamente al antígeno de FolR1 de la célula diana.
En otra realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende al menos dos restos de unión a antígeno (moléculas Fab), uno de los cuales es una molécula Fab sobrecruzada y uno de los cuales es una molécula Fab convencional. En una realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional.

Estos componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden fusionarse entre sí en una diversidad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se ilustran en las figuras 1A-I.

En algunas realizaciones, el primero y segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el primero y segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización similar, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional.

En una realización, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del segundo resto

de unión a antígeno, y el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización similar, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

En otras realizaciones, el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización particular similar, el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el segundo resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o de la segunda subunidad del dominio Fc. En una realización similar, el primer y el segundo resto de unión a antígeno son ambos fragmentos Fab y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

Los restos de unión a antígeno pueden estar fusionados al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un enlazador peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los enlazadores peptídicos se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Los

enlazadores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los enlazadores peptídicos $(G_4S)_n$ (SEC ID Nº: 300), $(SG_4)_n$ (SEC ID Nº: 301), $(G_4S)_n$ (SEC ID Nº: 300) o $G_4(SG_4)_n$ (SEC ID Nº: 302). "n" es generalmente un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4. Un enlazador peptídico particularmente adecuado para fusionar las cadenas ligeras de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno entre sí es $(G_4S)_2$ (SEC ID Nº: 303). Un enlazador peptídico adecuado para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno es EPKSC(D)-$(G_4S)_2$.(SEC ID Nº: 304 y 305). Adicionalmente, los enlazantes pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. Particularmente en los casos donde un resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo N-terminal de una subunidad de dominio Fc, puede fusionarse a través de una región bisagra de inmunoglobulina o una porción del mismo, con o sin un enlazador peptídico adicional.

Los inventores de la presente invención han descubierto que la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dos restos de unión a antígeno específicos para el antígeno de FolR1 de la célula diana tiene características superiores en comparación con la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende solo el resto de unión para el antígeno de FolR1 de la célula diana.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífico activadora de células T de la invención comprende además un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a FolR1. En una realización similar, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y de CDR de cadena ligera idénticas. En una realización similar, el tercer resto de unión a antígeno es idéntico al segundo resto de unión a antígeno (es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos).

En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una

primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En una realización similar, el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo y tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del tercer resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de célula T de la invención comprende cinco cadenas polipeptídicas que forman un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno en el que el primer resto de unión a antígeno es capaz de unirse a CD3 y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son cada uno capaces de unirse al receptor 1 de folato (FolR1). La primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden, en dirección de amino (N)-terminal a carboxilo (C)-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (VLD1) y un primer dominio constante de cadena ligera (CLD1). La tercera cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, un segundo dominio variable de cadena ligera (VLD2) y un segundo dominio constante 1 de cadena pesada (CH1D2). La cuarta cadena polipeptídica comprende, en dirección de N-terminal a C-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (VHD1), un primer dominio constante 1 de cadena pesada (CH1D1), un primer dominio constante 2 de cadena pesada (CH2D1) y un primer dominio constante 3 de cadena pesada (CH3D1). La quinta cadena polipeptídica comprende VHD1, CH1D1, un segundo dominio variable de cadena pesada (VHD2), un segundo dominio constante de cadena ligera (CLD2), un segundo dominio constante 2 de cadena pesada (CH2D2) y un segundo dominio constante 3 de cadena pesada (CH3D2). La tercera cadena polipeptídica y VHD2 y CLD2 de la quinta cadena polipeptídica forman el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3. La segunda cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la quinta cadena polipeptídica forman el tercer resto de unión capaz de unirse a FolR1. La primera cadena polipeptídica y VHD1 y CH1D1 de la cuarta cadena polipeptídica forman el segundo resto de unión capaz de unirse a FolR1.

En otra realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan

cada uno al extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera o segunda subunidad del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En una realización específica similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más enlazadores peptídicos, en la que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la primera subunidad del dominio Fc y el primer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del tercer resto de unión a antígeno. En una realización similar, el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas. En otra realización similar, el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada y el segundo y tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 es una molécula Fab convencional. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno pueden estar adicionalmente fusionadas entre sí.

Los restos de unión a antígeno pueden estar fusionados al dominio Fc a través de un enlazador peptídico. En una realización particular, los restos de unión a antígeno se fusionan cada uno al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En una realización específica, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG_1 humana.

En una realización, el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina. En una realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase IgG. En una realización aún más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG_1. En otra realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG_4. En una realización particular adicional, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otras realizaciones, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada.

En una realización particular, en dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio

Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas, en la que el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 37, SEC ID Nº: 38 y SEC ID Nº: 39 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 17 y SEC ID Nº: 18 y al menos una CDR de cadena ligera seleccionada entre el grupo de SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33 y SEC ID Nº: 34.

En una realización particular, en dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, en la que el primero, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son fragmentos Fab convencionales y tienen cadenas ligeras (VLCL) idénticas, en la que el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 36, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 31; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 15, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 31.

En una realización particular, en dicha molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T el primer y el segundo resto de unión a antígeno y el dominio Fc son parte de una molécula de inmunoglobulina, y el tercer resto de unión a antígeno está fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab al extremo N-terminal de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno y el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 es una molécula Fab sobrecruzada en la que las regiones variables o

constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están intercambiadas, en la que el primer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a CD3 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 36, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 31; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno capaz de unirse específicamente a FolR1 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 55, una cadena ligera variable que comprende una secuencia de SEC ID Nº: 65.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es monovalente para cada antígeno. En una realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede unirse a CD3 humana y al receptor alfa de folato (FolR1) humano y se elaboró sin emplear una estrategia de heterodimerización, tal como, por ejemplo, la tecnología de pomos en agujeros. Por ejemplo, la molécula puede producirse empleando una biblioteca de cadena ligera común y tecnología CrossMab. En una realización particular, la región variable de las moléculas de unión a CD3 se fusiona al dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano convencional para formar la molécula cruzada VLVH (fusionada a Fc) que es común para ambas especificidades. Para generar los homólogos cruzados (VHCL), se fusiona un dominio variable de cadena pesada específico de CD3 a una cadena ligera humana constante mientras que un dominio variable de cadena pesada específico para FolR1 (por ejemplo, aislado de una biblioteca de cadena ligera común) se fusiona a una cadena ligera humana constante. La molécula resultante deseada con cadenas correctamente emparejadas comprende cadenas ligeras tanto kappa como lambda o fragmentos de las mismas. En consecuencia, esta especie de moléculas biespecíficas puede purificarse a partir de especies mal emparejadas u homodiméricas con etapas de purificación secuencial que seleccionan respecto de cadena ligera kappa y lambda, en ambas secuencias. En una realización particular, la purificación del anticuerpo biespecífico deseado emplea etapas posteriores de purificación con columnas KappaSelect y LambdaFabSelect (GE Healthcare) para eliminar los anticuerpos homodiméricos no deseados.

Dominio Fc

El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, comprendiendo cada subunidad de este los dominios constantes CH2 y CH3 de la cadena pesada de la

IgG. Las dos subunidades del dominio Fc son capaces de asociarse de manera estable entre sí. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención comprende no más de un dominio Fc.

En una realización de acuerdo con la invención, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es un dominio Fc de IgG. En una realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1. En otra realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_4. En una realización más específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_4 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular, la sustitución de aminoácidos S228P. Esta sustitución de aminoácidos reduce el intercambio de brazo de Fab *in vivo* de los anticuerpos de IgG_4 (véase Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En una realización particular adicional el dominio Fc es humano. Una secuencia ejemplar de una región Fc de IgG_1 humana se proporciona en la SEC ID Nº: 245.

Modificaciones de dominio Fc que promueven la heterodimerización

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de acuerdo con la invención comprenden diferentes restos de unión a antígeno, fusionados a una o a la otra de las dos subunidades del dominio Fc, por lo tanto, las dos subunidades del dominio Fc comprenden típicamente dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización da lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T en producción recombinante, será por lo tanto ventajoso introducir en el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

Por consiguiente, en realizaciones particulares del dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífico activadora de células T de acuerdo con la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensiva entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana se encuentra en el dominio CH3 del dominio Fc. Por lo tanto, en una realización, dicha modificación es en el dominio CH3 del dominio Fc.

En una realización específica, dicha modificación es una modificación denominada de "pomo en agujero", que comprende una modificación de "pomo" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "agujero" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de pomo en agujero se describe, por ejemplo, en los documentos US

5.731.168; US 7.695.936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) y en Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el método implica introducir una protuberancia ("pomo") en la interfaz de un primer polipéptido y una correspondiente cavidad ("agujero") en la interfaz de un segundo polipéptido, de tal forma que la protuberancia puede posicionarse en la cavidad para promover la formación de heterodímero e impedir la formación de homodímero. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido con cadenas más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido sustituyendo cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

Por consiguiente, en una realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de los la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención se reemplaza un resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga un volumen de cadena lateral mayor, generando de este modo una protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad que puede posicionarse en una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad en el dominio CH3 de la segunda subunidad en la que puede posicionarse la protuberancia en el dominio CH3 de la primera subunidad.

La protuberancia y la cavidad pueden efectuarse alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis de sitio dirigido, o mediante síntesis peptídica.

En una realización específica, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza por un resto de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc el resto de tirosina en la posición 407 se reemplaza por un resto de valina (Y407V). En una realización, en la segunda subunidad del dominio Fc el resto de treonina en la posición 366 se reemplaza adicionalmente con un resto de serina (T366S) y el resto de leucina en la posición 368 se reemplaza con un resto de alanina (L368A).

En una realización adicional más, en la primera subunidad del dominio Fc el resto de serina en la posición 354 se reemplaza adicionalmente por un resto de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc el resto de tirosina en la posición 349 se reemplaza adicionalmente por un resto de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos restos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, de este modo estabilizando adicionalmente al dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15

(2001)).

En una realización particular, el resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3 se fusiona (opcionalmente a través del resto de unión a antígeno capaz de unirse a FolR1 en un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación de "pomo"). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la fusión del resto de unión a antígeno capaz de unirse a CD3 a la subunidad que contiene el pomo del dominio Fc minimizará (adicionalmente) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos restos de unión a antígeno capaces de unirse a CD3 (choque estérico de dos polipéptidos que contienen pomos).

En una realización alternativa, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media efectos de direccionamiento electrostático, por ejemplo, tal como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este método implica el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc por medio de restos de aminoácidos cargados de tal forma que la formación de homodímeros es electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

Modificaciones de dominio Fc que suprimen la unión a receptor Fc y/o la función efectora

El dominio Fc confiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una relación de distribución tejido-sangre favorable. A la vez puede, sin embargo, dan lugar a un direccionamiento no deseado de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T a células que expresan receptores Fc en vez de a las células portadoras de antígeno preferidas. Además, la activación conjunta de las rutas de señalización de receptor Fc pueden dar lugar a liberación de citocinas que, en combinación con las propiedades de activación de células T y la larga semivida de la molécula de unión a antígeno, da como resultado la activación excesiva de los receptores de citocinas y graves efectos secundarios tras su administración sistémica. La activación de células inmunes (portadoras de receptor Fc) distintas de células T puede incluso reducir la eficacia de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T debido a la destrucción potencial de células T, por ejemplo, por células NK.

Por consiguiente, en realizaciones particulares, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de acuerdo con la invención muestra afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o función efectora

reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo. En una realización similar, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestra menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20%, más preferentemente menos de un 10% y lo más preferentemente menos de un 5% de la afinidad de unión a un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG_1 nativo), y/o menos de un 50%, preferentemente menos de un 20%, más preferentemente menos de un 10% y lo más preferentemente menos de un 5% de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG_1 nativo). En una realización, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce función efectora. En una realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En una realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En una realización, el receptor Fc es un receptor Fc activante. En una realización específica, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano activante, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. En una realización, la función efectora es una o más seleccionada entre el grupo de CDC, ADCC, ADCP, y secreción de citocinas. En una realización particular, la función efectora es ADCC. En una realización, el dominio Fc muestra una afinidad de unión sustancialmente similar al receptor de Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio de Fc de IgG_1 nativo. La unión sustancialmente similar a FcRn se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestra más de aproximadamente un 70%, particularmente más de aproximadamente un 80%, más particularmente más de aproximadamente un 90% de la afinidad de unión de un dominio Fc de una IgG_1 nativa (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc de IgG_1 nativo) a FcRn.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc está diseñado para tener afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. En realizaciones particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc y/o la función efectora. Típicamente, están presentes las mismas una o más mutaciones de aminoácidos en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En una realización, la mutación de aminoácidos reduce la afinidad de unión del dominio Fc a

un receptor de Fc. En una realización, la mutación de aminoácidos reduce la afinidad del dominio Fc para un receptor Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces. En realizaciones en las que hay más de una mutación de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor Fc, la combinación de estas mutaciones de aminoácidos puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces, o al menos 50 veces. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc diseñado muestra menos de un 20 %, particularmente menos de un 10 %, más particularmente menos de un 5 % de la afinidad de unión a un receptor de Fc en comparación con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc no diseñado. En una realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En algunas realizaciones, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En algunas realizaciones, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En una realización específica, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano activante, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunas realizaciones, la afinidad de unión a un componente de complemento, específicamente, la afinidad de unión a C1q, también se reduce. En una realización, la afinidad de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) no se reduce. La unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del dominio Fc a dicho receptor, se consigue cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicho dominio Fc) muestra más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma no diseñada del dominio Fc (o de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende dicha forma no diseñada del dominio Fc) a FcRn. El dominio Fc, o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que comprenden dicho dominio Fc, pueden mostrar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. En determinadas realizaciones, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T está diseñada para que tenga función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. La función efectora reducida puede incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígeno mediada por complejo inmune por células presentadoras de antígenos reducida, unión a células NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células

polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce apoptosis reducida, reticulación reducida de anticuerpos unidos a diana, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos T reducido. En una realización, la función efectora reducida es una o más seleccionada entre el grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida, y secreción de citocinas reducida. En una realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En una realización, la ADCC reducida es menor del 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no diseñado (o por una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc no diseñado).

En una realización, la mutación de aminoácidos que reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor de Fc y/o la función efectora es una sustitución de aminoácidos. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329. En una realización más específica, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada entre el grupo de L234, L235 y P329. En algunas realizaciones, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A. En una realización similar, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1, particularmente, un dominio Fc de IgG_1 humana. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329. En una realización más específica, la sustitución de aminoácidos es P329A o P329G, particularmente P329G. En una realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329 y una sustitución adicional de aminoácidos en una posición seleccionada entre E233, L234, L235, N297 y P331. En una realización más específica, la sustitución adicional de aminoácidos es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En realizaciones particulares, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones P329, L234 y L235. En realizaciones más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (“P329G LALA”). En una realización similar, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG_1, particularmente, un dominio Fc de IgG_1 humana. La combinación de sustituciones de aminoácidos "P329G LALA" suprime prácticamente por completo la unión a receptor de Fcγ de un dominio Fc de IgG humana, tal como se describe en la publicación PCT n.º W0 2012/130831, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad. El documento WO 2012/130831 también describe métodos para preparar dichos dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como unión a receptor Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos de IgG_4 muestran afinidad de unión reducida a receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos de IgG_1. De este modo, en algunas realizaciones, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno

biespecíficas activadoras de linfocitos T de la invención es un dominio Fc de IgG_4, particularmente, un dominio Fc de IgG_4 humana. En algunas realizaciones, el dominio Fc de IgG_4 comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, específicamente, la sustitución de aminoácidos S228P. Para reducir adicionalmente su afinidad de unión a un receptor Fc y/o su función efectora, en una realización, el dominio Fc de IgG_4 comprende una sustitución de aminoácidos en la posición L235, específicamente, la sustitución de aminoácidos L235E. En otra realización, el dominio Fc de IgG_4 comprende una sustitución de aminoácidos en la posición P329, específicamente, la sustitución de aminoácidos P329G. En una realización particular, el dominio Fc de IgG_4 comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente, las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y P329G. Dichos mutantes de dominio Fc de IgG_4 y sus propiedades de unión a receptor de Fcγ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad.

En una realización particular, el dominio Fc que muestra afinidad de unión reducida a un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo, es un dominio Fc de IgG_1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG_4 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y opcionalmente P329G.

En determinadas realizaciones, se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En una realización similar, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácidos en la posición N297, particularmente una sustitución de aminoácidos que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT WO 2012/130831, Los dominios Fc con unión a receptor Fc reducida y/o funciones efectoras también incluyen aquellos con sustituciones de uno o más de los restos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de restos 265 y 297 a alanina (Patente de los Estados Unidos 7.332.581).

Los dominios Fc mutantes pueden prepararse mediante eliminación de aminoácidos, sustitución, inserción o modificación usando métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis de sitio específico de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica, y similares. Los cambios de nucleótidos correctos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación.

La unión a receptores Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA, o mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando instrumentación convencional, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc, tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Un ensayo de unión similar adecuado se describe en el presente documento. Como alternativa, la afinidad de dominios Fc o de moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un dominio Fc para receptores de Fc puede evaluarse usando líneas celulares que se sabe que expresan receptores de Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan receptor FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende un dominio Fc, puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. En el presente documento se describe un ensayo adecuado para medir la ADCC. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.500.362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente de Estados Unidos Nº 5.821.337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, La actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunas realizaciones, la unión del dominio Fc a un componente de complemento, específicamente a C1q, se reduce. Por consiguiente, en algunas realizaciones en las que el dominio Fc está diseñado para tener función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es capaz de unirse a C1q y por lo tanto tener actividad de CDC. Véase, por ejemplo, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para determinar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Propiedades biológicas y características funcionales de

moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T

Un experto en la materia puede apreciar la eficacia ventajosa de una molécula que distingue de manera selectiva entre células cancerosas y no cancerosas sanas. Una forma de lograr este objetivo es mediante la selección de la diana adecuada. Los marcadores expresados exclusivamente en células tumorales pueden emplearse para dirigir de manera selectiva a moléculas o células efectoras a células tumorales a la vez que se evitan las células normales que no expresan dicho marcador. Sin embargo, en algunos casos, los marcadores celulares denominados tumorales también se expresan en tejido normal, aunque a niveles menores. Esta expresión en tejidos normales da lugar a la posibilidad de toxicidad. Por lo tanto, había una necesidad en la técnica de moléculas que puedan dirigirse de manera más selectiva a células tumorales. La invención descrita en el presente documento proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que se dirigen de manera selectiva a células tumorales positivas a FolR1 y no a células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende al menos dos, preferentemente dos, restos de unión a FolR1 de relativamente baja afinidad que confieren un efecto de avidez que permite la diferenciación entre células con alta y baja expresión de FolR1. Debido a que las células tumorales expresan FolR1 a niveles elevados o intermedios, esta realización de la invención se une de manera selectiva a, y/o induce la eliminación de células tumorales y no células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T está en el formato invertido 2+1. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales y no tumorales positivas a FolR1 mediada por células T y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T no induce la eliminación de células normales que tienen menos de 1000 copias de FolR1 en su superficie.

Además de las características ventajosas anteriores, una realización de la invención

no necesita reticulación química o una estrategia híbrida para su producción. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T capaz de producirse en células CHO. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende polipéptidos humanizados y humanos. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T no causa reticulación de FcgR. En una realización similar, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T es capaz de producción en células CHO y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

Como se ha indicado anteriormente, algunas realizaciones contempladas en el presente documento incluyen moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que tienen dos restos de unión que confieren unión específica a FolR1 y un resto de unión que confiere especificidad para el antígeno CD3 activador de células T, en el que cada resto de unión a FolR1 individual se acopla al antígeno con baja afinidad. Debido a que la molécula comprende dos restos de unión a antígeno que confieren unión a FolR1, la avidez general de la molécula, sin embargo, proporciona unión eficaz a células diana que expresan FolR1 y activación de células T para inducir función efectora de células T. Teniendo en consideración que mientras que FolR1 se expresa a diversos niveles en células tumorales, también se expresa a niveles muy bajos (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 copias sobre la superficie celular) en determinadas células normales, un experto en la materia puede reconocer fácilmente la eficacia ventajosa de dicha molécula para su uso como agente terapéutico. Dicha molécula se dirige de manera selectiva a células tumorales frente a células normales. Dicha molécula, por lo tanto, puede administrarse a un individuo que la necesite con una preocupación significativamente menor acerca de la toxicidad resultante de las células normales positivas a FolR1 en comparación con moléculas que se unen a FolR1 con alta afinidad para inducir función efectora. En una realización preferida, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T tienen una afinidad de unión monovalente a huFolR1 en el intervalo micromolar y una avidez por huFolR1 en el intervalo nanomolar.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 40 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 10 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 10 nM y aproximadamente 30 nM, respectivamente. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 1400 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 1400 nM y a FolR1 de cinomolgo con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 5600 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 10 nM y con una K_D de unión monovalente de aproximadamente 1400 nM.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D aparente de aproximadamente 5,36 pM a aproximadamente 4 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 murino con una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano y de cinomolgo con una K_D aparente de aproximadamente 4 nM, se une a FolR1 murino con una K_D aparente de aproximadamente 1,5 nM, y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de

SEC ID Nº: 54. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se une a FolR1 humano con una K_D de unión monovalente de al menos aproximadamente 1000 nM y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

Tal como se ha descrito anteriormente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T contempladas en el presente documento pueden inducir función efectora de células T, por ejemplo, expresión de marcadores de la superficie celular, producción de citocinas, eliminación mediada por células T. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación mediada por células T de la célula diana que expresa FolR1, tal como una célula tumoral humana, *in vitro*. En una realización, la célula T es una célula T CD8 positiva. Los ejemplos de células tumorales que expresan FolR1 incluyen, pero sin limitación, células HeLa, Skov-3, HT-29, y HRCEpiC. Otras células cancerosas humanas positivas a FolR1 que pueden usarse para ensayos *in vitro* están fácilmente disponibles para el experto en la materia. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de células tumorales humanas que expresan FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 39573 pM después de 24 horas. Se contemplan específicamente moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que inducen la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 36 pM después de 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 178,4 pM tras 24 horas. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T induce la eliminación de la célula tumoral que expresa FolR1 mediada por células T *in vitro* con una CE50 de aproximadamente 134,5 pM o mayor tras 48 horas. La CE50 puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante métodos divulgados en el presente documento en los ejemplos.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores induce la regulación positiva

de la expresión de la superficie celular de al menos uno de CD25 y CD69 sobre la célula T según se mide mediante citometría de flujo. En una realización, la célula T es una célula T CD4 positiva o una célula T CD8 positiva.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a FolR1 expresado en una célula tumoral humana. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de las realizaciones anteriores se une a un epítopo conformacional en FolR1 humano. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células de cualquiera de las realizaciones anteriores T no se une al receptor de folato 2 humano (FolR2) o al receptor de folato 3 humano (FolR3). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno se une a un polipéptido de FolR1 que comprende los aminoácidos 25 a 234 de FolR1 humano (SEC ID Nº: 227). En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 227, a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 230 y a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 o 229. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende un resto de unión a antígeno de FolR1 que se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 227, 230 y 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228 o 229, y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 8, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 9, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 50, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 52, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 53, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 54.

En una realización de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de cualquiera de cualquiera de las realizaciones anteriores, el resto de unión a antígeno de FolR1 se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 227 a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228, 229 o 230. En una realización específica, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T comprende un resto de unión a antígeno de FolR1 que se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 227 y a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 231, y en el que el resto de unión a antígeno de FolR1 no se une a un polipéptido de FolR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 228, 229 o 230, y comprende un resto de unión a antígeno de CD3 que comprende la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 37, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 38, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 39, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34 y dos restos de unión a FolR1 que comprenden cada uno la CDR1 de cadena pesada de SEC ID Nº: 16, la CDR2 de cadena pesada de SEC ID Nº: 275, la CDR3 de cadena pesada de SEC ID Nº: 315, la CDR1 de cadena ligera de SEC ID Nº: 32, la CDR2 de cadena ligera de SEC ID Nº: 33, y la CDR3 de cadena ligera de SEC ID Nº: 34.

Con respecto a FolR1, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T contempladas en el presente documento pueden tener un efecto agonista, antagonista o neutro. Los ejemplos de efecto agonista incluyen la inducción o potenciación de la señalización a través de FolR1 tras la unión del resto de unión a FolR1 al receptor de FolR1 en la célula diana. Los ejemplos de actividad antagonista incluyen la abrogación o reducción de la señalización a través de FolR1 tras la unión del resto de unión a FolR1 al receptor de FolR1 en la célula diana. Esto puede, por ejemplo, suceder bloqueando o reduciendo la interacción entre folato con FolR1. Se contemplan específicamente variantes de secuencia de las realizaciones divulgadas en el presente documento que tienen menos afinidad a la vez que retienen las propiedades biológicas descritas anteriormente.

Inmunoconjugados

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T conjugada a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T tal como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma.

Los polinucleótidos de la invención incluyen a aquellos que son al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idénticos a las secuencias expuestas en las SEC ID Nº: 151-226, incluyendo fragmentos funcionales o variantes de los mismos.

Los polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden expresarse como un solo polinucleótido que codifica a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T o en forma de múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se expresan de manera conjunta. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se expresan de manera conjunta pueden asociarse a través, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T funcional. Por ejemplo, la parte de cadena ligera de un resto de unión a antígeno puede estar codificada por un polinucleótido separado de la parte de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende la parte de cadena pesada del resto de unión a antígeno, una subunidad de dominio Fc y opcionalmente (parte de) otro resto de unión a antígeno. Cuando se expresan de manera conjunta, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar el resto de unión a antígeno. En otro ejemplo, la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende una de las dos subunidades de dominio Fc y opcionalmente (parte de) uno o más restos de unión a antígeno podría estar codificado por un polinucleótido separado de la parte de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que comprende a la otra de las dos subunidades de dominio Fc y opcionalmente (parte de) un resto de unión a antígeno. Cuando se expresan de manera conjunta, las subunidades de dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunas realizaciones, el polinucleótido aislado codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en el presente documento. En otras realizaciones, el polinucleótido aislado codifica polipéptidos comprendidos en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en el presente documento.

En otra realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que

codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de región variable tal como se muestra en las SEC ID Nº: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 y 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223. En otra realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T o un fragmento de la misma, en la que el polipéptido comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica tal como se muestra en las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, , 58, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 1, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111.112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244. En otra realización, la invención se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una secuencia nucleotídica mostrada en las SEC ID Nº: 97, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 12, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 246, 247. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos mostrada en las SEC ID Nº: 97, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 12, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 246, 247. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de región variable que es al menos

aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos en las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11,13, 15, 19, 21, 12, 25, 27, 29, 31, 36, 41, 45, 49, 51, 55, 58, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 82, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 12, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende una o más secuencias que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a una secuencia de aminoácidos en las SEC ID Nº: 8, 9, 50, 37, 38, y 39. La invención abarca un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia de la región variable de las SEC ID Nº: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 y 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223 con sustituciones conservativas de aminoácidos. La invención también abarca un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia polipeptídica de las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 1, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111.112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 con sustituciones conservativas de aminoácidos.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Métodos recombinantes

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, mediante síntesis peptídica en estado

sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento), por ejemplo, tal como se han descrito anteriormente, se aíslan e insertan en uno o más vectores para clonación adicional y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales. En una realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Pueden usarse métodos bien conocidos en la técnica para los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento) junto con señales de control transcripcional/traduccional adecuadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Aususbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento) (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la traducción. Tal como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA, o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si están presentes, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, regiones 5' y 3' no traducidas, y similares, no son parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan post- o co-traduccionalmente en las proteínas finales mediante escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido, o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya estén fusionados o no fusionados a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento) de la invención, o una variante o

derivado de la misma. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal secretoria o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operativa sucede cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal modo que sitúan la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la secuencia reguladora (o las secuencias reguladoras). Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado a esta) se "asocian operativamente" si la inducción de la función de promotor da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de la expresión de las secuencias reguladoras para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por lo tanto, una región promotora estará asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, aparte de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Los promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estos incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano intermedio, en conjunción con el intrón A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano), y retrovirus (tales como, por ejemplo, virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrado, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y globina-â de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores específicos de tejido y potenciadores, así como promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclinas inducibles por promotores). De manera similar, los expertos habituales en la materia conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y terminación de la traducción, y elementos derivados de sistemas virales (particularmente un sitio de entrada a ribosoma interno, o IRES, también citado como una secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otras

características, tales como un origen de replicación, y/o elementos de integración a cromosomas, tales como repeticiones terminales largas retrovirales (LTR), o repeticiones terminales invertidas (ITR) virales adeno-asociadas (AAV).

Las regiones codificantes del polinucleótido y ácido nucleico de la presente invención pueden asociarse con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretorios o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, puede situarse el ADN que codifica una secuencia de señal cadena arriba del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células Te la invención o un fragmento de la misma. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido de señal o secuencia líder secretoria que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la materia son conscientes de que los polipéptidos secretados por células de vertebrado generalmente tienen un péptido de señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, el péptido de señal nativo, por ejemplo, se usa un péptido de señal de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de aquella secuencia que mantiene la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que está asociado de manera operativa con este. Como alternativa, puede usarse un péptido de señal heterólogo de mamífero o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede sustituirse con la secuencia líder del activador de plasminógeno de tejido humano (TPA) o de β-glucuronidasa de ratón.

Puede incluirse ADN que codifica una secuencia corta de proteína que puede usarse para facilitar su posterior purificación (por ejemplo, un marcador de histidina) o para asistir en el marcado de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T dentro o en los extremos del polinucleótido codificante de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T (o fragmento).

En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En determinadas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en el presente documento en relación a polinucleótidos y vectores, respectivamente. En una realización similar, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que

codifica (parte de) una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que pueda modificarse por ingeniería genética para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención o fragmentos de las mismas. Las células hospedadoras adecuadas para replicar y para soportar la expresión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T se conocen bien en la técnica. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según sea adecuado con el vector de expresión particular y pueden cultivarse grandes cantidades de células que contienen vector para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para aplicaciones clínicas. Las células hospedadoras adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o varias células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto, o similares. Por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesita la glucosilación. Después de la expresión, el polipéptido puede aislarse a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras son adecuados para clonación u hospedadores de expresión para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), y Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (vertebrados e invertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse en conjunción con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). Las células de vertebrados también pueden usarse como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles células de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono trasformada mediante SV40 (COS-7), la línea de riñón embriónico humano (células 293 o 293T tal como se describen, por ejemplo, en Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de sertoli de ratón

(células TM4 tal como se describen, por ejemplo, en Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI (tal como se describen, por ejemplo, en Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5, y células FS4. Otras líneas celulares de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO dhfr$^-$ (Urlaub, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003). Las células hospedadoras incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido animal. En una realización, la célula hospedadora es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, Y0, NS0, Sp20).

Se conocen tecnologías estándar en la técnica para expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende bien la cadena pesada o la cadena ligera de un dominio de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, pueden modificarse por ingeniería genética para también expresar la otra de las cadenas del anticuerpo de tal forma que el producto expresado es un anticuerpo que tiene tanto una cadena ligera como una cadena pesada.

En una realización, se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, tal como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, y recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la célula hospedadora (o medio de cultivo de la célula hospedadora).

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se fusionan genéticamente entre sí. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede diseñarse de tal modo que sus

componentes se fusionen directamente entre sí o a través de una secuencia enlazadora. La composición y longitud del enlazador puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y puede ensayarse respecto de su eficacia. Los ejemplos de secuencias enlazadoras entre diferentes componentes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T se encuentran en las secuencias proporcionadas en el presente documento. También pueden incluirse secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión si se desea, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de endopeptidasa.

En determinadas realizaciones, los uno o más restos de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T comprenden al menos una región variable de anticuerpo capaz de unirse a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte y proceder de anticuerpos de origen natural o no natural y fragmentos de los mismos. Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos de origen no natural pueden construirse usando síntesis peptídica en fase sólida, pueden producirse de manera recombinante (por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 4.186.567, por ejemplo, explorando bibliotecas combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.969.108, McCafferty).

Pueden usarse anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, dominios de unión a antígeno o regiones variables de cualquier especie animal en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios de unión a antígeno o regiones variables no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, de primate o humano. Si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T está prevista para su uso en seres humanos, puede usarse una forma quimérica del anticuerpo en la que las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. Una forma humanizada o completamente humana del anticuerpo también puede prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nº 5.565.332 de Winter). La humanización puede lograrse mediante varios métodos incluyendo, pero sin limitación (a) injerto de las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones marco conservadas y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de restos marco conservados críticos (por ejemplo, aquellos que son importantes para mantener una buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), (b) injerto solo de las regiones determinantes de la

especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los restos críticos para la interacción antígeno-anticuerpo) en regiones marco conservadas y constantes humanas, o (c) trasplante de los dominios variables no humanos completos, pero "revistiéndolos" con una sección similar a humana mediante sustitución de restos superficiales. Los anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); Patentes de los Estados Unidos Nº 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (que describe la “reformación de superficies”); Dall’Acqua et al., Methods 36, 43-60 (2005) (que describe el “reordenamiento de FR”); y Osbourn et al., Methods 36, 61-68 (2005) y Klimka et al., Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de “selección guiada” para el reordenamiento de FR). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen de manera general en van Dijk y van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) y Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivarse de anticuerpos monoclonales humanos producidos por el método de hibridoma (véase, por ejemplo, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Los anticuerpos humanos y regiones variables humanas pueden prepararse también administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a provocación antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas también pueden generarse aislando secuencias de región variable de clon de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos derivadas de seres humanos (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al. en Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O’Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)). El fago presenta típicamente fragmentos de anticuerpo, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab.

En determinadas realizaciones, los restos de unión a antígeno útiles en la presente invención se diseñan para que tengan afinidad de unión potenciada de acuerdo con,

por ejemplo, los métodos divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0132066, cuyo contenido íntegro se incorpora al presente documento a modo de referencia. La capacidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención para unirse a un determinante antigénico específico puede medirse bien a través de un ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), y los ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compita con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular, por ejemplo, un anticuerpo que compite con el anticuerpo V9 por la unión a CD3. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) al que se une el anticuerpo de referencia. Los métodos ilustrativos detallados para mapear un epítopo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competición ejemplar, se incuba antígeno inmovilizado (por ejemplo, CD3) en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo, anticuerpo V9, descrito en el documento US 6.054.297) y un segundo anticuerpo que se esté ensayando para su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba un antígeno inmovilizado en una solución que comprende al primer anticuerpo marcado pero no al segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad del marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo en relación a la muestra de control, esto indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T preparadas tal como se describe en el presente documento pueden purificarse mediante técnicas conocidas en la materia, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína dependerán, en parte, de

factores tales como la carga neta, hidrofobicidad, hidrofilidad etc., y serán evidentes para los expertos en la materia. Para la purificación por cromatografía de afinidad puede usarse un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención, puede usarse una matriz con proteína A o proteína G. Pueden usarse cromatografía de afinidad a proteína A o G secuencial y cromatografía de exclusión por tamaño para aislar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede determinarse mediante cualquiera de una diversidad de métodos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis en gel, cromatografía líquida de alta presión, y similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión de cadena pesada expresadas tal como se describen en los Ejemplos demostraron ser intactas y ensamblarse correctamente tal como se demuestra mediante SDS-PAGE reductora (véase, por ejemplo, la figura 2). Se resolvieron tres bandas a aproximadamente PM 25.000, PM 50.000 y PM 75.000, correspondientes a los pesos moleculares predichos de la cadena ligera, la cadena pesada y la proteína de fusión de cadena pesada/cadena ligera de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T.

Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento pueden identificarse, seleccionarse, o caracterizarse según sus propiedades físicas y químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

Puede determinarse la afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T por un receptor de Fc o por un antígeno diana de acuerdo con los métodos expuestos en los ejemplos mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación convencional, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana tales como las que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Como alternativa, puede evaluarse la unión de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T a diferentes receptores o antígenos diana usando líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). Una realización ilustrativa y ejemplar para medir la afinidad de unión se

describe a continuación y más adelante en los ejemplos.

De acuerdo con una realización, la K_D se mide mediante resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

Para analizar la interacción entre la parte Fc y los receptores de Fc, se captura receptor de Fc recombinante marcado con His mediante un anticuerpo anti-penta His ("Penta His", divulgado como SEC ID Nº: 306) (Qiagen) inmovilizado sobre microplacas CM5 y las construcciones biespecíficas se usan como analitos. En resumen, se activan microplacas de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se disuelve anticuerpo anti-penta His ("Penta His", divulgado como SEC ID Nº: 306) con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, a 40 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para lograr aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Posteriormente, el receptor Fc se captura durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las medidas cinéticas se inyectan diluciones en serie de cuatro veces de la construcción biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.

Para determinar la afinidad al antígeno diana, se capturan construcciones biespecíficas mediante un anticuerpo específico anti Fab humano (GE Healthcare) que se inmoviliza sobre una superficie de microplaca sensora CM5 activada tal como se describe para el anticuerpo anti penta-His ("Penta His", divulgado como SEC ID Nº: 306). La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000 UR. Las construcciones biespecíficas se capturan durante 90 s a 300 nM. Se hacen pasar los antígenos diana a través de las celdas de flujo durante 180 s a un intervalo de concentración desde 250 hasta 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. La disociación se controla durante 180 s.

Se corrigen las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Se usó la respuesta de estado estacionario para derivar la constante de disociación K_D mediante ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (programa de evaluación BIACORE® versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

Puede medirse la actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención mediante diversos ensayos, tal como se describe en los ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de la proliferación de células T, la inducción de la señalización en células T, la inducción de marcadores de activación en células T, la inducción de la secreción de citocinas por células T, la inducción de la lisis de células diana, tales como células tumorales, y la inducción de la regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y rutas de administración

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos siguientes. En una realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

Además se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en una forma adecuada para su administración *in vivo*, comprendiendo el método (a) obtener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la invención, y (b) formular la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, mediante el cual se formula una preparación de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para su administración *in vivo*.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T disueltas o dispersas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que generalmente no son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y

concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporada al presente documento por referencia. Además, para administración animal (por ejemplo, a seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, tal como requiere la Agencia de Estándares biológicos de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferidas son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye a cualquiera y a todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterias, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizantes de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tintes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como sabrá un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329, incorporado al presente documento por referencia). Excepto en el caso de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol, y de si necesita ser estéril para dichas vías de administración tales como inyección. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la presente invención (y cualquier agente terapéutico adicional) pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intraesplénica, intrarrenal, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntiva, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando a las células diana directamente, a través de un catéter, mediante una lavativa, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o mediante otro método o

cualquier combinaciones de los anteriores como sabrán los expertos habituales en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado al presente documento por referencia). La administración parenteral, en particular, la inyección intravenosa, se usa de manera más común para administrar moléculas polipeptídicas, tales como las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención.

Las composiciones parenterales incluyen aquellas diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes formulatorios, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados a continuación, según sea necesario. Puede lograrse fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsiones, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o criodesecación que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido esterilizado por filtración del mismo. El medio líquido debe estar tamponado de manera adecuada en caso necesario y el diluyente líquido se hará primeramente isotónico antes de la inyección con suficiente suero salino o glucosa. La composición tiene que ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse al mínimo a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio;

fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener compuestos que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano, o similares. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones elevadamente concentradas. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones para inyección oleosas adecuadas. Los disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18a Ed. Mack Printing Company, 1990). Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen al polipéptido, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. En realizaciones particulares, puede lograrse la absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso de agentes que retrasen la absorción en las composiciones, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células También pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de larga duración pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las moléculas de unión

a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite adecuado) o resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden fabricarse mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional en uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de las proteínas en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden formularse en una composición en una forma de ácido o base libre, neutra o en forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que mantienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteinácea, o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico o ácido mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también puede derivarse a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienen a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

Métodos terapéuticos y composiciones

Puede usarse cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T proporcionadas en el presente documento en métodos terapéuticos. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden usarse como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

Para su uso en métodos terapéuticos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T pueden formularse, dosificarse y administrarse de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de

administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios.

En un aspecto, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En determinadas realizaciones, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención para su uso en un método de tratamiento. En una realización, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesita. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T. En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente anticáncer si la enfermedad que va a tratarse es cáncer. En realizaciones adicionales, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T tal como se describe en el presente documento para su uso en la inducción de la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En determinadas realizaciones, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para su uso en un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tenga la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En una realización

particular, la enfermedad es cáncer. En una realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente anticáncer si la enfermedad que va a tratarse es cáncer. En una realización adicional, el medicamento es para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En una realización adicional más, el medicamento es para su uso en un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. En una realización se administra una composición a dicho individuo que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En una realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinadas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente anticáncer si la enfermedad que va a tratarse es cáncer. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral. En una realización, el método comprende poner en contacto una célula diana con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención en presencia de una célula T, en particular de linfocitos T citotóxicos. En un aspecto adicional, se proporciona un método para inducir la lisis de una célula diana, particularmente una célula tumoral, en un individuo. En una realización similar, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T para inducir la lisis de una célula diana. En una realización, un "individuo" es un ser humano.

En determinadas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo, particularmente cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de

colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer sanguíneo, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer óseo, y cáncer de riñón. Otros trastornos de la proliferación celular que pueden tratarse usando una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la presente invención incluyen, pero sin limitación, neoplasias localizadas en: el abdomen, huesos, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica, y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis cancerosas. En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de células renales, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que en muchos casos la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede no proporcionar una cura, sino solo proporcionar un beneficio parcial. En algunas realizaciones, también se considera terapéuticamente beneficioso un cambio fisiológico que tenga cierto beneficio. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se considera que una cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T que proporciona un cambio fisiológico es una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunas realizaciones, se administra a una célula una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. En otras realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención a un individuo para el tratamiento de enfermedades.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención (cuando se usa sola o en combinación con otros uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, de la vía de administración, del peso corporal del paciente, del tipo de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se administra con fines preventivos o terapéuticos, de intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, del historial clínico del paciente y de la respuesta a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T, y del criterio del médico tratante. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de ingrediente activo (o ingredientes activos) en una

composición y la dosis adecuada para el sujeto individual. Se contemplan en el presente documento varias pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitación a administraciones individuales o múltiples a lo largo de varios instantes, administración de bolo e infusión pulsada.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg10 mg/kg) de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede ser una dosis inicial posible para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/g a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento será generalmente sostenido hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos ni limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de los anteriores. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc. basándose en los números descritos anteriormente. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) se puede administrar al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente,

por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T). Se puede administrar una dosis inicial más elevada, seguida por una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención se usarán generalmente en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. Para su uso en el tratamiento o prevención de una patología, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos.

Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, *por ejemplo,* modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en la materia. Un experto habitual en la materia podrá fácilmente optimizar la administración a seres humanos basándose en datos de animales.

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para su administración mediante inyección están en el intervalo de 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Los niveles en plasma terapéuticamente eficaces pueden lograrse administrando múltiples dosis cada día. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por HPLC.

En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto habitual en la materia será capaz de optimizar dosis locales terapéuticamente eficaces sin experimentación innecesaria.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno

biespecíficas activadoras de células T descritas en el presente documento proporcionarán generalmente un beneficio terapéutico sin causar una toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivo o en animales experimentales. Los ensayos en cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50}. Se prefieren moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T que muestren altos índices terapéuticos. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de acuerdo con la presente invención muestra un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. La dosificación se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, el estado del sujeto, y similares. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, cap. 1, pág. 1, incorporada en este documento por referencia en su totalidad).

El médico tratante de pacientes tratados con moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención sabrá cómo y cuando terminar, interrumpir, o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica, y similares. Por el contrario, el médico tratante también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el control del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección a tratar, con la vía de administración, y similares. La gravedad de la afección puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, por medio de métodos de evaluación pronósticos estándar. Además, la dosis y quizá la frecuencia de la dosis también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal, y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la

invención pueden administrarse en combinación con otros uno o más agentes en terapia. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. La expresión "agente terapéutico" abarca cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesite dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier principio activo adecuado para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. En determinadas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular, o un agente que aumenta la sensibilidad de las células a inductores de la apoptosis. En una realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente anticáncer, por ejemplo, un disruptor de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, un intercalador de ADN, un agente alquilante, una terapia hormonal, un inhibidor de cinasas, un antagonista de receptores, un activador de la apoptosis de células tumorales, o un agente anti-angiogénico.

Dichos otros agentes están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para el fin previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T empleada, del tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T se usan generalmente en las mismas dosis y con rutas de administración como las descritas en el presente documento, o a aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es adecuada.

Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en composiciones separadas), y administrarse por separado, en cuyo caso, la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención puede suceder antes de, de manera simultánea, y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de células T de la invención pueden usarse en combinación con radioterapia.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende a) un primer sitio de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31; y b) un segundo sitio de unión a antígeno que comprende un dominio

variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 36 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31 para su uso en combinación con un anticuerpo para PD-L1 o FAP-4-1BBL. En una realización, este anticuerpo biespecífico comprende además un tercer sitio de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) de SEC ID Nº: 274 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID Nº: 31.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de células T de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), suero salino tamponado con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Ejemplos

Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción

general proporcionada anteriormente.

Métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular el ADN tal como se describen en Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos moleculares biológicos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general referente a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se proporciona en: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Publicación NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria convencional en Synergene (Shlieren).

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados necesarios se generaron bien por PCR usando moldes adecuados o se sintetizaron por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automatizada. En los casos donde no estaba disponible una secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos basándose en las secuencias a partir de los homólogos más cercanos y los genes se aislaron mediante RT-PCR a partir del ARN originado a partir del tejido adecuado. Los segmentos génicos flaqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singulares se clonaron en vectores de clonación/secuenciación estándar. El ADN de plásmido se purificó a partir de bacterias transformadas y se determinó la concentración mediante espectroscopía UV. La secuencia de ADN de los fragmentos génicos succionados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los segmentos génicos se diseñaron con sitios de restricción adecuados para permitir la sub-clonación en los vectores de expresión respectivos. Todas las construcciones se diseñaron con una secuencia de ADN de extremo 5' que codificaba un péptido líder que dirige a las proteínas para su secreción en células eucariotas.

Aislamiento de pan células T primarias a partir de PBMC

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de bancos de sangre locales o a partir de

sangre fresca de donantes humanos sanos. En resumen, se diluyó la sangre con PBS estéril y se dispuso cuidadosamente en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, H8889). Después de centrifugar durante 30 minutos a 450 x g a temperatura ambiente (freno desconectado), se desechó parte del plasma sobre la interfase que contenía PBMC. Las PBMC se transfirieron a tubos Falcon nuevos de 50 ml y se rellenaron los tubos con PBS hasta un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 x g (freno conectado). Se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 350 x g). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640, que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en el incubador hasta el comienzo del ensayo.

El enriquecimiento en células T a partir de PBMC se llevó a cabo usando el kit Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec n.º 130-091-156), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sedimentos celulares se diluyeron en 40 µl de tampón frío por cada 10 millones de células (PBS con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM, esterilizado por filtración) y se incubaron con 10 µl de cóctel de anticuerpo-biotina por cada 10 millones de células durante 10 min a 4 °C. Se añadieron 30 µl de tampón frío y 20 µl de perlas magnéticas anti-biotina por cada 10 millones de células, y la mezcla se incubó durante otros 15 min a 4 °C. Las células se lavaron añadiendo 10-20x el volumen actual y una etapa posterior de centrifugación a 300 x g durante 10 min. Se resuspendieron hasta 100 millones de células en 500 µl de tampón. La separación magnética de pan células T humanas no marcadas se llevó a cabo usando columnas LS (Miltenyi Biotec n.º 130-042-401) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de células T resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio AIM-V a 37 °C, CO_2 al 5 % en el incubador hasta el comienzo del ensayo (no más de 24 h).

Aislamiento de células T primarias no expuestas previamente a partir de PBMC

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de bancos de sangre locales o a partir de sangre fresca de donantes humanos sanos. El enriquecimiento en células T a partir de PBMC se llevó a cabo usando el kit de aislamiento de células T $CD8^+$ no expuestas previamente de Miltenyi Biotec (n.º 130-093-244), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero omitiendo la última etapa de aislamiento de células T $CD8^+$ (véase también la descripción para el aislamiento de células T primarias humanas).

Aislamiento de pan células T murinas a partir de esplenocitos

Se aislaron bazos de ratones C57BL/6, se transfirieron a un tubo GentleMACS C (Miltenyi Biotech n.º 130-093-237) que contenía tampón MACS (PBS + BSA al 0,5 % + EDTA 2 mM) y se disociaron con el disociador GentleMACS para obtener suspensiones de células individuales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se hizo pasar la suspensión celular a través de un filtro de pre-separación para eliminar las partículas de tejido no disociadas restantes. Después de la centrifugación a 400 x g durante 4 min a 4 °C, se añadió tampón de lisis ACK a los glóbulos rojos lisados (incubación durante 5 min a temperatura ambiente). Las células restantes se lavaron con tampón MACS dos veces, se contaron y se usaron para el aislamiento de pan células T murinas. La selección negativa (magnética) se llevó a cabo usando el kit Pan T Cell Isolation de Miltenyi Biotec (n.º 130-090-861), siguiendo las instrucciones del fabricante. La población de células T resultante se contó de manera automática (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos posteriores.

Aislamiento de PBMC de cinomolgo primarios a partir de sangre heparinizada

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación de densidad a partir de sangre fresca de donantes de cinomolgo sanos, del modo siguiente: Se diluyó la sangre heparinizada a 1:3 con PBS estéril, y se diluyó medio Lymphoprep (Axon Lab n.º 1114545) al 90 % con PBS estéril. Se dispusieron en capas dos volúmenes de la sangre diluida sobre un volumen del gradiente de densidad diluido y se separó la fracción de PBMC mediante centrifugación durante 30 min a 520 x g, sin frenada, a temperatura ambiente. La banda de PBMC se transfirió a un tubo Falcon nuevo de 50 ml y se lavó con PBS estéril mediante centrifugación durante 10 min a 400 x g a 4 °C. Se llevó a cabo una centrifugación a baja velocidad para eliminar los sedimentos (15 min a 150 x g, 4 °C), y la población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos posteriores.

Ejemplo 1

Purificación de fusiones de receptor de folato-Fc

Para generar nuevos anticuerpos contra FolR1 humano se crearon los siguientes antígenos y herramientas de exploración como proteínas de fusión a Fc monovalente (el dominio extracelular del antígeno unido a la región bisagra de Fc-pomo que se expresa conjuntamente con una molécula Fc-agujero). Se sintetizaron los genes del

antígeno (Geneart, Regensburg, Alemania) basándose en las secuencias obtenidas de GenBank o SwissProt y se insertaron en vectores de expresión para generar proteínas de fusión con Fc-pomo con un marcador Avi C-terminal para la biotinilación *in vivo* o *in vitro*. La biotinilación *in vivo* se logró mediante la expresión conjunta del gen birA bacteriano que codifica una ligasa de biotina bacteriana durante la producción. La expresión de todos los genes estuvo bajo el control de un promotor MPSV quimérico en un plásmido que contenía un elemento oriP para el mantenimiento estable de los plásmidos en líneas celulares que contenían EBNA.

Para la preparación de las moléculas de fusión de antígeno monomérico/Fc biotiniladas, se transfectaron de manera conjunta células HEK293 EBNA en suspensión que crecían de manera exponencial con tres vectores que codificaban los dos componentes de la proteína de fusión (cadenas de pomo y agujero) así como BirA, una enzima necesaria para la reacción de biotinilación. Los vectores correspondientes se usaron a una relación de 9,5: 9,5: 1 (“ECD de antígeno- Fc pomo-marcador avi”: “Fc agujero”: “BirA”).

Para la producción de proteína, en matraces agitados de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 g, y se reemplazó al sobrenadante por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se resuspendieron en 20 ml de medio CD CHO que contenía 200 µg de ADN de vector. Después de la adición de 540 µl de polietilenimina (PEI), la solución se mezcló durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadieron ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % (Lonza) al cultivo. El medio de producción también se suplementó con biotina 100 µM. Después de 7 días de cultivo, el sobrenadante celular se recogió mediante eliminación por centrifugación de las células durante 15 min a 210 g. La solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm), se suplementó con azida de sodio hasta una concentración final del 0,01 % (p/v), y se mantuvo a 4 °C.

Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Para la cromatografía de afinidad, se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap ProteinA HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7,5. La proteína

unida se eluyó usando un gradiente de pH lineal creado en 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0. Entonces se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM, pH 3,0.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8,0. La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6,0.

La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de la fusión FolR1-Fc se analizó mediante electroforesis de capilaridad en SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). El contenido agregado de las muestras se analizó usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada con K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C.

Las proteínas de fusión antígeno-Fc purificadas se analizaron mediante ensayos de resonancia de plasmón superficial usando anticuerpos disponibles comercialmente para confirmar la conformación correcta y natural de los antígenos (datos no mostrados).

Tabla 1: Antígenos producidos para el aislamiento, selección y contraselección de anticuerpos de FolR1 humano

Antígeno	**ECD (aa)**	**Número de referencia**	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
FolR1 humano	25 - 234	P15328	RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPED KLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKD VSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDT CLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVL NVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNW HKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYF PTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCI QMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM	227
FolR2 humano	17 - 230	P14207	TMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKPG PEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQEL HKDTSRLYNFNWDHCGKMEPACKRHFI	228

Antígeno	**ECD (aa)**	**Número de referencia**	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
			QDTCLYECSPNLGPWIQQVNQSWRKE RFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCK SNWHRGWDWTSGVNKCPAGALCRTF ESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSRG SGRCIQMWFDSAQGNPNEEVARFYAA AMHVN	
FolR3 humano	24 - 243	P41439	SARARTDLLNVCMNAKHHKTQPSPEDE LYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTS RLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCL YECSPNLGPWIRQVNQSWRKERILNVP LCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHK GWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTP AALCEGLWSHSFKVSNYSRGSGRCIQM WFDSAQGNPNEEVAKFYAAAMNAGAP SRGIIDS	229
FolR1 murino	25 - 232	P35846	TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNL HDQCSPWKTNSCCSTNTSQEAHKDISY LYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCLY ECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDVPL CKEDCQQWWEDCQSSFTCKSNWHKG WNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTS AALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQM WFDPAQGNPNEEVARFYAEAMS	230
FolR1 de cinomolgo	25 - 234	G7PR14	EAQTRTARARTELLNVCMNAKHHKEKP GPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQE AHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRH FIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRK ERVLNVPLCKEDCERWWEDCRTSYCK SNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPF HFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSRGS GRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAA MS	231

Tabla 2: Resumen del rendimiento y contenido final de monómero de las fusiones

FolR1-FC.

Antígeno	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento
huFolR1	100	30 mg/l
cyFolR1	100	32 mg/l
muFolR1	100	31 mg/l
huFolR2	100	16 mg/l
huFolR3	95	38 mg/l

Ejemplo 2

Generación de cadena ligera común con especificidad de CD3ε

Las moléculas biespecíficas activadoras de células T descritas en el presente documento comprenden al menos un resto de unión a CD3. Este resto puede generarse inmunizando a animales de laboratorio, explorando fagotecas o usando anticuerpos anti-CD3 conocidos. La cadena ligera común con especificidad de CD3ε se generó humanizando la cadena ligera de un anticuerpo progenitor murino anti-CD3ε (CH2527). Para la humanización de un anticuerpo de origen no humano, los restos de CDR del anticuerpo no humano (donante) tienen que trasplantarse a la región marco conservada de un anticuerpo humano (aceptor). En general, las secuencias marco conservadas aceptoras se seleccionan alineando la secuencia del donante a una colección de secuencias aceptoras potenciales y seleccionando una que tenga bien una homología razonable con el donante, o bien que muestre aminoácidos similares en algunas posiciones críticas para la estructura y actividad. En el presente caso, la búsqueda de la región marco conservada aceptora de anticuerpo se llevó a cabo alineando la secuencia de dominio VL de ratón del anticuerpo parental con una colección de secuencias de línea germinal humana y seleccionando la secuencia humana que mostró una elevada identidad de secuencia. Sorprendentemente, se encontró una buena coincidencia en cuanto a homología de secuencia marco conservada en una cadena ligera humana bastante infrecuente perteneciente a la familia 7 de dominio V de tipo lambda, más precisamente, hVL_7_46 (nomenclatura IMGT, n.º de referencia de GenBank Z73674). Esta cadena ligera humana infrecuente se seleccionó posteriormente como región marco conservada aceptora para la humanización de la cadena ligera de

CH2527. Las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del dominio variable de cadena ligera de ratón se injertaron en esta región marco conservada aceptora. Ya que la región marco conservada 5 no es parte de la región variable del gen V de línea germinal, el alineamiento para esta región (elemento J) se efectuó de manera individual. De este modo se seleccionó la secuencia IGLJ3-02 para la humanización de esta cadena ligera.

Se generaron trece variantes humanizadas (CH2527-VL7_46-1 a VL7_46-10, VL7_46-12 a VL7_46-14). Estas difieren en los restos marco conservados (y combinaciones de los mismos) que se retromutaron a la secuencia de dominio V murina o en restos de CDR (definición de Kabat) que pudieron mantenerse idénticos a la secuencia de línea germinal humana. Se retromutaron los siguientes restos marco conservados fuera de las CDR a los restos murinos en la variante de dominio VL humanizada final VL7_46-13 (restos murinos listados): V36, E38, F44, G46, G49, y G57, respectivamente. El elemento J humano IGLJ3-02 fue 100 % idéntico al elemento J del anticuerpo progenitor murino.

Ejemplo 3

Evaluación por SPR de variantes humanizadas con especificidad por CD3ε

Se evaluaron las variantes de VL humanizadas como quimeras en un formato clásico 2+1 (figura 1D), es decir, los dominios V de cadena ligera humanizados se emparejaron con dominio V de cadena pesada murina. La evaluación por SPR se llevó a cabo en un instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Más precisamente, las variantes se capturaron directamente del sobrenadante de cultivo en una microplaca sensora GLM derivatizada anti-Fab (IgG de cabra anti-humano, específica de fragmento $F(ab')_2$, Jackson ImmunoResearch) en orientación vertical. Los analitos siguientes se inyectaron posteriormente de manera horizontal como concentraciones individuales para evaluar la unión a CD3ε de humano y de cinomolgo: 3 µM de hu CD3ε(-1-26)-Fc(pomo)-avi (ID807) y 2,5 µM cy CD3ε-(-1-26)-Fc(pomo)-Avi-Fc(agujero) (ID873), respectivamente. Las respuestas de unión se compararon cuantitativamente a la unión de la construcción murina de control y se graduaron como + (unión comparable observada), +/- (unión reducida observada) y – (sin unión observada). El anticuerpo de captura se regeneró después de cada ciclo de captura de ligando y unión de ligando y se volvió a inyectar la construcción murina al final del estudio para confirmar la actividad de la superficie de captura. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Variante VL humanizadada	Unión a CD3ε
murine_CH2527-VL	+
CH2527-VL7_46-1	-
CH2527-VL7_46-2	-
CH2527-VL7_46-3	-
CH2527-VL7_46-4	-
CH2527-VL7_46-5	-
CH2527-VL7_46-6	-
CH2527-VL7_46-7	-
CH2527-VL7_46-8	-
CH2527-VL7_46-9	-
CH2527-VL7_46-10	-
CH2527-VL7_46-12	+/-
CH2527-VL7_46-13	**+**
CH2527-VL7_46-14	-

Tabla 3 Evaluaciones de unión cualitativas basadas en SPR para las variantes de cadena ligera humanizada combinadas con la cadena pesada murina de CH2527. Finalmente solo se seleccionó la variante de cadena ligera humanizada, CH2527-VL7_46-13, remarcada con letras en negrita, que mostró unión comparable a CD3ε de humano y de cinomolgo.

Ejemplo 4

Propiedades de la cadena ligera común humanizada con especificidad de CD3ε

La variante de dominio V de cadena ligera que se seleccionó para la molécula principal humanizada es VL7_46-13. Se determinaron tres grados de humanidad, es decir, la homología de secuencia del dominio V humanizado con la secuencia de dominio V de línea germinal humana. Para VL7_46-13, la identidad de secuencia general con el homólogo más próximo de línea germinal humana es del 65 % antes de la humanización y del 80 % posteriormente. Omitiendo las regiones CDR, la identidad de secuencia es del 92 % con el homólogo de línea germinal humana más próximo. Como puede observarse a partir de la tabla 3, VL7_46-13 es la única variante de VL humanizada de un panel de 13 variantes que mostraron unión comparable a la del anticuerpo murino progenitor y también retuvo su reactividad cruzada con CD3ε de cinomolgo. Este resultado indica que no fue trivial humanizar el dominio VL murino sin perder la afinidad de unión a CD3ε, que requería varias retromutaciones a restos marco conservados murinos (en particular, G46) mientras que se mantenía G24 en la CDR1. Además, este resultado muestra que el dominio

VL desempeña un papel crucial en el reconocimiento de diana. De manera importante, el dominio VL humanizado VL7_46-13 basado en una línea germinal humana infrecuente perteneciente a la familia 7 de dominio V de tipo lambda y que mantiene afinidad y especificidad por CD3ε, también es adecuado para su uso como cadena ligera común en bibliotecas de presentación en fagos del formato Fab y permite una selección satisfactoria de nuevas especificidades que facilitan en gran medida la generación y producción de moléculas biespecíficas que se unen a CD3ε y, por ejemplo, una diana tumoral y que comparten la misma cadena ligera "común".

Ejemplo 5

Generación de una biblioteca de anticuerpos presentada en fagos usando una cadena ligera común de línea germinal humana procedente de HVK1-39

Varias estrategias para generar anticuerpos biespecíficos que se asemejan a IgG humanas de longitud completa utilizan modificaciones en la región Fc que inducen la heterodimerización de dos cadenas pesadas distintas. Dichos ejemplos incluyen tecnologías de pomos en agujeros (Merchan et al., Nat Biotechnol. jul 1998;16(7):677-81) SEED (Davis et al., Protein Eng Des Sel. abr 2010;23(4):195-202) y de direccionamiento electrostático (Gunasekaran et al., J Biol Chem. 18 de jun 2010;285(25):19637-46). Aunque estas estrategias permiten la heterodimerización eficaz de dos cadenas pesadas distintas, el emparejamiento adecuado de cadenas ligeras y pesadas afines sigue siendo un problema. El uso de una cadena ligera común (LC) puede resolver este problema (Merchant, et al. Nat Biotech 16, 677-681 (1998)).

En este caso se describe la generación de una biblioteca de anticuerpos para su presentación en un fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común"). Esta biblioteca se diseñó para generar anticuerpos multiespecíficos sin necesidad de usar tecnologías sofisticadas para evitar el mal emparejamiento de la cadena ligera.

Mediante el uso de una cadena ligera común, puede facilitarse la producción de estas moléculas y ya no aparece un mal emparejamiento y se facilita el aislamiento de un anticuerpo biespecífico altamente puro. En comparación con otros formatos, el uso de fragmentos Fab como bloques de construcción en contraposición a, por ejemplo, el uso de fragmentos scFv da como resultado una mayor estabilidad térmica y la ausencia de agregación de scFv y la formación de scFv intermoleculares.

Generación de la biblioteca

A continuación se describe la generación de una biblioteca de anticuerpo para la presentación en fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común").

Se usaron las siguientes cadenas pesadas en la biblioteca (números de referencia de GenBank entre paréntesis):

IGHV1-46*01 (X92343) (SEC ID Nº: 104),

IGHV1-69*06 (L22583), (SEC ID Nº: 105)

IGHV3-15*01 (X92216), (SEC ID Nº: 106)

IGHV3-23*01 (M99660), (SEC ID Nº: 107)

IGHV4-59*01 (AB019438), (SEC ID Nº: 108)

IGHV5-51*01 (M99686), (SEC ID Nº: 109)

Todas las cadenas pesadas usan IGHJ2 como elemento J, salvo IGHV1-69*06 que usa la secuencia IGHJ6. El diseño de la aleatorización incluyó la CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3. Para CDR-H1 y CDR-H2 se seleccionó una estrategia de aleatorización "leve", y los oligonucleótidos de aleatorización fueron tales que el codon para el aminoácido de la secuencia de línea germinal estaba presente al 50 %. Todos los demás aminoácidos, a excepción de cisteína, sumaron hasta el 50 % restante. En CDR-H3, donde no había aminoácidos de línea germinal debido a la presencia del elemento genético D, se diseñaron oligonucleótidos que permiten el uso de inserciones aleatorizadas entre el elemento V y el elemento J de 4 a 9 aminoácidos de longitud. Estos oligonucleótidos estaban contenidos en su parte aleatorizada, por ejemplo. Tres aminoácidos G/Y/S estaban presentes al 15 % cada uno, los aminoácidos A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E estaban presentes al 4,6 % cada uno.

Los métodos ejemplares para la generación de bibliotecas de anticuerpos se describen en Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133-413; Lee et., al J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073-1093.

La cadena ligera procede de la secuencia humana hVK1-39, y se usa de manera no modificada y no aleatorizada. Esto asegura que pueda usarse la misma cadena ligera para otros proyectos sin modificaciones adicionales.

Selección de biblioteca ejemplar:

Las selecciones con todas las bibliotecas de maduración por afinidad se llevan a cabo en solución de acuerdo con el siguiente procedimiento usando un dominio extracelular monomérico y biotinilado de un antígeno X diana.

1. Se unen 10^12 partículas de fagémido de cada biblioteca a 100 nM de antígeno soluble biotinilado durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml. 2. El antígeno biotinilado se captura y las partículas de fago unidas específicamente se aíslan mediante la adición de ~5 x 10^7 perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina

durante 10 min. 3. Las perlas se lavan usando 1 ml de PBS/Tween20 5-10x y 1 ml de PBS 5-10x. 4. La elución de las partículas de fago se efectúa mediante la adición de 1 ml de TEA (trietilamina) 100 mM durante 10 min y la neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris 1 M/HCl pH 7,4 y 5. reinfección de las bacterias TG1 de *E. coli* en crecimiento exponencial, infección con el fago auxiliar VCSM13 y se aplica posteriormente precipitación de PEG/NaCl de las partículas de fagémido en las rondas de selección posteriores. Las selecciones se llevan a cabo en 3-5 rondas usando concentraciones de antígeno constantes o menguantes (de 10^-7 a 2 x 10^-9 M). En la ronda 2, se efectúa la captura de complejos antígeno/fago usando placas de neutravidina en lugar de perlas de estreptavidina. Todas las reacciones de unión se suplementan bien con albúmina de suero bovino 100 nM, o con leche en polvo desgrasada para que compita con clones no deseados por la simple unión adhesiva de los anticuerpos al soporte de plástico.

Las selecciones se llevan a cabo durante tres o cuatro rondas usando concentraciones de antígeno menguantes del antígeno comenzando a 100 nM y menguando hasta 5 nM en la ronda final de selección. Las moléculas de unión específicas se definen como señales aproximadamente 5 x mayores que el fondo y se identifican mediante ELISA. Las moléculas de unión específicas se identifican mediante ELISA del modo siguiente: se recubren placas de neutravidina con 100 µl de antígeno biotinilado 10nM por pocillo. Los sobrenadantes bacterianos que contienen Fab se añaden y se detectan los Fab que se unen a través de sus marcadores Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones positivos al ELISA se expresan bacterianamente como fragmentos Fab solubles en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se someten a un experimento de exploración cinética mediante análisis por SPR usando el dispositivo ProteOn XPR36 (BioRad). Los clones que expresan Fab con las constantes de afinidad mayores se identifican y se secuencian los fagémidos correspondientes. Para la caracterización posterior, las secuencias de Fab se amplifican mediante PCR a partir del fagémido y se clonan mediante los sitios de restricción adecuados en vectores de expresión de IgG1 humana para su producción en mamíferos.

Generación de una biblioteca de anticuerpo presentada en fagos usando una cadena ligera común específica para CD3ε humanizado

En este caso se describe la generación de una biblioteca de anticuerpo para la presentación en fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común"). Esta biblioteca se diseñó para la generación de anticuerpos biespecíficos de células T inactivos que contienen Fc pero inactivos respecto a la unión a FcgR de isotipo de IgG1 P329G LALA o IgG4 SPLE PG en los que uno o dos Fab reconocen a un antígeno de superficie tumoral expresado en una célula

tumoral mientras que el resto del brazo de Fab del anticuerpo reconoce a CD3ε en una célula T.

Generación de la biblioteca

A continuación se describe la generación de una biblioteca de anticuerpo para la presentación en fago M13. Esencialmente, se diseñó una biblioteca de múltiples regiones marco conservadas para la cadena ligera con una cadena ligera constante (o "común"). Esta biblioteca se diseñó solamente para la generación de anticuerpos biespecíficos de células T inactivos que contienen Fc pero inactivos respecto a la unión a FcgR de isotipo de IgG1 P329G LALA o IgG4 SPLE PG.

Se introdujo diversidad aleatorizando oligonucleótidos solo en la CDR3 de las diferentes cadenas pesadas. Los métodos para la generación de bibliotecas de anticuerpo se conocen bien en la técnica y se describen en Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133-413; o en: Lee et., al J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073-1093).

Se usaron las siguientes cadenas pesadas en la biblioteca:

IGHV1-46*01 (X92343), (SEC ID Nº: 104)

IGHV1-69*06 (L22583), (SEC ID Nº: 105)

IGHV3-15*01 (X92216), (SEC ID Nº: 106)

IGHV3-23*01 (M99660), (SEC ID Nº: 107)

IGHV4-59*01 (AB019438), (SEC ID Nº: 108)

IGHV5-51*01 (M99686), (SEC ID Nº: 109)

Se usó la cadena ligera procedente del anticuerpo CH2527 específico de CD3ε de humano y de cinomolgo humanizado en la biblioteca: (VL7_46-13; SEC ID Nº: 112). Esta cadena ligera no se aleatorizó y se usó sin modificaciones adicionales para asegurar la compatibilidad con moléculas de unión biespecíficas diferentes.

Todas las cadenas pesadas usan IGHJ2 como elemento J, salvo IGHV1-69*06 que usa la secuencia IGHJ6. El diseño de la aleatorización se centró solo en la CDR-H3, y se diseñaron oligonucleótidos de PCR que permiten el uso de inserciones aleatorizadas entre el elemento V y el elemento J de 4 a 9 aminoácidos de longitud.

Ejemplo 6

Selección de fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas de cadena ligera común (que comprenden cadena ligera con especificidad de CD3ε) para FolR1

Los anticuerpos 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8, 19H3, 20G6, y 20H7 que comprenden la cadena ligera común VL7_46-13 con especificidad de CD3ε se obtuvieron mediante selecciones de

presentación en fagos frente a FolR1 de diferentes especies (humano, de cinomolgo y murino). Los clones 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 21D1, 16F12, 19H3, 20G6, y 20H7 se seleccionaron de una sub-biblioteca en la que la cadena ligera común se emparejó con un repertorio de cadena pesada basado en la línea germinal humana VH1_46. En esta sub-biblioteca, la CDR3 de VH1_46 se aleatorizó basándose en 6 longitudes diferentes de CDR3. Los clones 16D5, 15E12, 21A5, y 21G8 se seleccionaron de una sub-biblioteca en la que la cadena ligera común se emparejó con un repertorio de cadena pesada basado en la línea germinal humana VH3_15. En esta sub-biblioteca, la CDR3 de VH3_15 se aleatorizó basándose en 6 longitudes diferentes de CDR3. Para obtener anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con especies (o que reaccionan con FolR1 murino), se alternaron los FolR1 de diferentes especies (o se mantuvieron constantes) de diferentes maneras durante 3 ciclos de biopaneo: 16A3 y 15A1 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano); 18D3 (FolR1 de cinomolgo – humano – murino); 19E5 y 19A4 (3 ciclos frente a FolR1 murino); 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano); 19H3, 20G6, y 20H7 (3 ciclos frente a FolR1 murino).

Se expresaron de manera transitoria FolR1 de humano, murino y de cinomolgo como antígenos para las selecciones de presentación en fago así como para las exploraciones basadas en ELISA y en SPR como fusiones monoméricas N-terminales de Fc en células HEK EBNA e *in vivo* biotinilados en sitios específicos mediante la expresión conjunta de la ligasa de biotina BirA en la secuencia de reconocimiento del marcador avi situada en el extremo C-terminal de la parte Fc que porta la cadena de receptor (cadena Fc de pomo). Para evaluar la especificidad para FolR1, se generaron dos receptores relacionados, FolR2 y FolR3 humanos, del mismo modo.

Las rondas de selección (biopaneo) se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente patrón:

1. Pre-eliminación de ~ 10^{12} partículas de fagémido en placas maxisorp recubiertas con 10 µg/ml de una IgG humana no relacionada para empobrecer las bibliotecas de anticuerpos que reconocen la porción Fc del antígeno.

2. Incubación de las partículas de fagémido no de unión a Fc con 100 nM de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado durante 0,5 h en presencia de construcción de Fc de pomo en agujero no biotinilada no relacionada para la eliminación adicional de moléculas de unión a Fc en un volumen total de 1 ml.

3. Captura del FolR1 biotinilado y unido específicamente al fago de unión mediante transferencia a 4 pocillos de una placa de microtitulación pre-recubierta con

neutravidina durante 10 min (en las rondas 1 y 3).

4. Lavado de los pocillos respectivos usando PBS/Tween20 5x y PBS 5x.

5. Elución de las partículas de fago mediante la adición de 250 µl de TEA (trietilamina) 100 mM por pocillo durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris/HCl 1 M, pH 7,4 a las eluciones agrupadas de 4 pocillos.

6. Eliminación posterior de las eluciones neutralizadas mediante incubación en placa de microtitulación recubierta previamente con neutravidina con 100 nM de FolR2 o FolR3 capturado en biotina para la eliminación final de moléculas de unión a Fc y no específicas.

7. Re-infección de células TG1 de *E. coli* en fase logarítmica con el sobrenadante de las partículas de fago eluidas, infección con el fago auxiliar VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante toda una noche y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido para su uso en la siguiente ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo a lo largo de 3 rondas usando concentraciones de antígeno constante de 100 nM. En la ronda 2, para evitar el enriquecimiento de moléculas de unión a avidina, la captura de complejos de antígeno:fago se llevó a cabo mediante la adición de 5,4 x 10^7perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las moléculas de unión específicas se identificaron mediante ELISA del modo siguiente: Se recubrieron 100 µl de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado 25 nM y 10 µg/ml de IgG humana sobre placas de neutravidina y placas maxisorp, respectivamente. Los sobrenadantes bacterianos que contenían Fab se añadieron y se detectaron los Fab que se unen a través de sus marcadores Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que muestran señales en FolR1 humano y que son negativos en IgG humana se seleccionaron para análisis posteriores y también se ensayaron de un modo similar frente a las dos especies restantes de FolR1. Se expresaron de manera bacteriana en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purificaron por afinidad y se caracterizaron adicionalmente mediante análisis de SPR usando un biosensor ProteOn XPR36 de BioRad.

Las afinidades (K_D) de los clones seleccionados se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con FolR1 de humano, cinomolgo y murino biotinilado así como FolR2 y FolR3 humano (controles negativos) inmovilizados sobre placas NLC mediante captura de neutravidina. Inmovilización de antígenos (ligando): Los antígenos recombinantes se diluyeron con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a 10 µg/ml, después se inyectaron a 30 µl/minuto en orientación vertical.

Inyección de analitos: Para las medidas "cinéticas de una dosis", se cambió la dirección de la inyección a orientación horizontal, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab purificado (intervalos de concentración variantes) de manera simultánea en los canales 1-5 separados, con tiempos de asociación de 200 s, y tiempos de disociación de 600 s. El tampón (PBST) se inyectó en el sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referencia. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon un modelo de unión de Langmuir simple de uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on}. La Tabla 4 lista las constantes de equilibrio de disociación (K_D) de los clones seleccionados específicos para FolR1.

Tabla 4: Constantes de disociación de equilibrio (K_D) para anticuerpos anti-FolR1 (formato Fab) seleccionados mediante presentación de fagos a partir de sub-bibliotecas de cadena ligera común que comprenden VL7_46-13, una cadena ligera humanizada específica para CD3ε. K_D en nM.

Clon	huFolR1 [nM]	cyFolR1 [nM]	muFolR1 [nM]	huFolR2 [nM]	huFolR3 [nM]
16A3	21,7	18	muy débil	sin unión	sin unión
15A1	30,9	17,3	muy débil	sin unión	sin unión
18D3	93,6	40.2	muy débil	sin unión	sin unión
19E5	522	276	19,4	sin unión	sin unión
19A4	2050	4250	43,1	sin unión	sin unión
15H7	13,4	72,5	sin unión	sin unión	sin unión
15B6	19,1	13,9	sin unión	sin unión	sin unión
16D5	39,5	114	sin unión	sin unión	sin unión
15E12	55,7	137	sin unión	sin unión	sin unión
21D1	62,6	32,1	sin unión	sin unión	sin unión
16F12	68	90,9	sin unión	sin unión	sin unión
21A5	68,8	131	sin unión	sin unión	sin unión
21G8	130	261	sin unión	sin unión	sin unión
19H3	sin unión	sin unión	89,7	sin unión	sin unión
20G6	sin unión	sin unión	78,5	sin unión	sin unión

Ejemplo 7

Selección de fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas de múltiples regiones marco conservadas genéricas para FolR1

Los anticuerpos 11F8, 36F2, 5D9, 6B6, y 14E4 se obtuvieron mediante selecciones de presentación en fagos basadas en sub-bibliotecas de múltiples regiones marco conservadas genéricas contra FolR1 de diferentes especies (humano, cinomolgo y murino). En estas sub-bibliotecas de múltiples regiones marco conservadas genéricas, se emparejan dominios VL diferentes con CDR3 aleatorizadas (3 longitudes diferentes) con diferentes dominios VH diferentes con CDR3 aleatorizadas (6 longitudes diferentes). Los clones seleccionados son de los siguientes emparejamientos VL/VH: 11F8 (Vk_1_5/VH_1_69), 36F2 (Vk_3_20/VH_1_46), 5D9 (Vk3_20/VH1_46), 6B6 (Vk3_20/VH1_46), y 14E4 (Vk3_20/VH3_23). Para obtener anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con especies (o que reaccionan con FolR1 murino), se alternaron los FolR1 de diferentes especies (o se mantuvieron constantes) de diferentes maneras durante 3 o 4 ciclos de biopaneo: 11F8 (FolR1 de cinomolgo – murino – humano); 36F2 (FolR1 humano – murino – de cinomolgo – murino); 5D9 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano); 6B6 (FolR1 de humano – cinomolgo – humano) y 14E4 (3 rondas frente a FolR1 murino).

Se expresaron de manera transitoria FolR1 de humano, murino y de cinomolgo como antígenos para las selecciones de presentación en fago así como para las exploraciones basadas en ELISA y en SPR como fusiones monoméricas N-terminales de Fc en células HEK EBNA e *in vivo* biotinilados en sitios específicos mediante la expresión conjunta de la ligasa de biotina BirA en la secuencia de reconocimiento del marcador avi situada en el extremo C-terminal de la parte Fc que porta la cadena de receptor (cadena Fc de pomo). Para evaluar la especificidad para FolR1, se generaron dos receptores relacionados, FolR2 y FolR3 humanos, del mismo modo.

Las rondas de selección (biopaneo) se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente patrón:

1. Pre-eliminación de ~ 10^{12} partículas de fagémido en placas maxisorp recubiertas con 10 µg/ml de una IgG humana no relacionada para empobrecer las bibliotecas de anticuerpos que reconocen la porción Fc del antígeno.

2. Incubación de las partículas de fagémido no de unión a Fc con 100 nM de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado durante 0,5 h en presencia de construcción de Fc de pomo en agujero no biotinilada no relacionada para la eliminación adicional de moléculas de unión a Fc en un volumen total de 1 ml.

3. Captura del FolR1 biotinilado y unido específicamente al fago de unión mediante transferencia a 4 pocillos de una placa de microtitulación pre-recubierta con neutravidina durante 10 min (en las rondas 1 y 3).

4. Lavado de los pocillos respectivos usando PBS/Tween20 5x y PBS 5x.

5. Elución de las partículas de fago mediante la adición de 250 µl de TEA (trietilamina) 100 mM por pocillo durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris/HCl 1 M, pH 7,4 a las eluciones agrupadas de 4 pocillos.

6. Eliminación posterior de las eluciones neutralizadas mediante incubación en placa de microtitulación recubierta previamente con neutravidina con 100 nM de FolR2 o FolR3 capturado en biotina para la eliminación final de moléculas de unión a Fc y no específicas.

7. Re-infección de células TG1 de *E. coli* en fase logarítmica con el sobrenadante de las partículas de fago eluidas, infección con el fago auxiliar VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante toda una noche y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido para su uso en la siguiente ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo a lo largo de 3 rondas usando concentraciones de antígeno constante de 100 nM. En las rondas 2 y 4, para evitar el enriquecimiento de moléculas de unión a avidina, la captura de complejos de antígeno:fago se llevó a cabo mediante la adición de 5,4 x 10^7perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Las moléculas de unión específicas se identificaron mediante ELISA del modo siguiente: Se recubrieron 100 µl de FolR1 de humano, cinomolgo o murino biotinilado 25 nM y 10 µg/ml de IgG humana sobre placas de neutravidina y placas maxisorp, respectivamente. Los sobrenadantes bacterianos que contenían Fab se añadieron y se detectaron los Fab que se unen a través de sus marcadores Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que muestran señales en FolR1 humano y que son negativos en IgG humana se seleccionaron para análisis posteriores y también se ensayaron de un modo similar frente a las dos especies restantes de FolR1. Se expresaron de manera bacteriana en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purificaron por afinidad y se caracterizaron adicionalmente mediante análisis de SPR usando un biosensor ProteOn XPR36 de BioRad.

Las afinidades (K_D) de los clones seleccionados se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con FolR1 de humano, cinomolgo y murino biotinilado así como FolR2 y FolR3 humano (controles negativos) inmovilizados sobre placas NLC mediante captura de neutravidina. Inmovilización de antígenos (ligando): Los antígenos recombinantes se

diluyeron con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a 10 µg/ml, después se inyectaron a 30 µl/minuto en orientación vertical. Inyección de analitos: Para las medidas "cinéticas de una dosis", se cambió la dirección de la inyección a orientación horizontal, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab purificado (intervalos de concentración variantes) de manera simultánea en los canales 1-5 separados, con tiempos de asociación de 150 o 200 s, y tiempos de disociación de 200 o 600 s, respectivamente. Se inyectó tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referenciar. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon un modelo de unión de Langmuir simple de uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on}. La Tabla 5 lista las constantes de equilibrio de disociación (K_D) de los clones seleccionados específicos para FolR1.

Tabla 5: Constantes de disociación de equilibrio (K_D) para anticuerpos anti-FolR1 (formato Fab) seleccionados mediante presentación en fagos a partir de sub-librerías de múltiples regiones marco conservadas genéricas. K_D en nM.

	K_D (nM)				
Clon	**huFolR1**	**cyFolR1**	**muFolR1**	**huFolR2**	**huFolR3**
11F8	632	794	1200	sin unión	sin unión
36F2	1810	1640	737	sin unión	sin unión
5D9	8,6	5,29	sin unión	sin unión	sin unión
6B6	14,5	9,4	sin unión	sin unión	sin unión
14E4	sin unión	sin unión	6,09	sin unión	sin unión

Ejemplo 8

Producción y purificación de nuevas moléculas de unión a FolR1 en formatos de IgG y biespecíficos de células T

Para identificar moléculas de unión a FolR1 que son capaces de inducir la eliminación dependiente de células T de células diana seleccionadas, se convirtieron los anticuerpos aislados a partir de una cadena ligera común o biblioteca de Fab en el formato de IgG1 humano correspondiente. En resumen, las cadenas pesada variable y ligera variable de moléculas de unión a FolR1 únicas a partir de presentación en fagos se amplificaron mediante reacciones PCR convencionales

usando los clones de Fab como molde. Los productos de la PCR se purificaron e insertaron (bien mediante clonación basada en endonucleasa de restricción y ligasa, o mediante "diseño recombinante" usando el kit InFusion de Invitrogen) en vectores de expresión adecuados en los que se fusionan a las cadenas pesadas constantes humanas o cadenas ligeras constantes humanas adecuadas. Los casetes de expresión en estos vectores consisten en un promotor de MPSV quimérico y un sitio de poliadeniliación sintético. Además, los plásmidos contienen la región oriP del virus de Epstein Barr para el mantenimiento estable de los plásmidos en células HEK293 que portan el antígeno nuclear EBV (EBNA). Después de la transfección mediada por PEI, los anticuerpos se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A convencional seguido de cromatografía de exclusión por tamaño, tal como se describe:

Transfección y producción transitoria

Todos los anticuerpos (biespecíficos) (si no se obtuvieron de una fuente comercial) usados en el presente documento se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantiene a 4 °C. Después de la producción se recogen los sobrenadantes y los sobrenadantes que contienen anticuerpo se filtraron a través de

filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación de anticuerpos

Todas las moléculas se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna HiTrap PA FF (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 5 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 12 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron a 2 ml usando ultraconcentradores) Vivaspin 15R 30,000 MWCO HY, Sartorius) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Las fracciones que contenían menos de un 2 % de oligómeros se agruparon y concentraron a una concentración final de 1 - 1,5 mg/ml usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius). La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Basándose en los resultados de caracterización *in vitro* las moléculas de unión seleccionadas se convirtieron a un formato biespecífico de célula T. En estas moléculas, los restos de unión de FolR1:CD3 están dispuestos en un orden de 2:1, situándose los Fabs de FolR1 en el extremo N-terminal. Para los clones aislados a partir de la biblioteca de Fab convencional, la parte de unión a CD3 se generó como un CrossFab (cruzamiento CH1Cκ) mientras que para los clones de la biblioteca de la cadena ligera común no fue necesario el cruzamiento. Estas moléculas biespecíficas se produjeron y purificaron de manera análoga a las IgG.

Tabla 6: Rendimiento y contenido de monómero de nuevas moléculas de unión a FolR1 en formato IgG y TCB, respectivamente.

			IgG		TCB	
Nº	**Clon**	**Biblioteca**	**Rendimiento [mg/l]**	**Monómero [%]**	**rendimiento [mg/l]**	**Monómero [%]**
1	11F8	Fab	8,03	96,26	--	--
2	14E4	Fab	8,90	98,12	--	--
3	15B6	CLC	7,72	100,00	--	--
4	15E12	CLC	6,19	100,00	--	--
5	15H7	CLC	8,94	100,00	--	--
6	16A3	CLC	0,60	n.d.	--	--
7	16D5	CLC	36,50	96,96	4,36	97,19
8	16F12	CLC	5,73	97,17	--	--
9	18D3	CLC	0,90	n.d.	--	--
10	19A4	CLC	38,32	100,00	37,50	100,00
11	19E5	CLC	46,09	100,00	--	--
12	19H3	CLC	7,64	100,00	--	--
13	20G6	CLC	24,00	100,00	--	--
14	20H7	CLC	45,39	100,00	--	--
15	21A5	CLC	1,38	98,56	47,31	95,08
16	21D1	CLC	5,47	100,00	--	--
17	21G8	CLC	6,14	97,28	9,27	100,00
18	36F2	Fab	11,22	100,00	18,00	100,00
19	5D9	Fab	20,50	100,00	0,93	97,32
20	6B6	Fab	3,83	100,00	4,17	91,53
21						

CLC: Cadena ligera común

Ejemplo 9

Formatos biespecíficos de célula T 2+1 y 1+1

Se prepararon cuatro formatos biespecíficos de célula T para una molécula de unión de cadena ligera común (16D5)) para comparar sus propiedades de eliminación *in vitro*.

El formato convencional es el formato invertido 2+1 tal como ya se ha descrito

(restos de unión a FolR1:CD3 dispuestos en un orden 2:1 situándose los Fab de FolR1 en el extremo N-terminal). En el formato 2+1 clásico, los restos de unión a FolR1:CD3 están dispuestos en un orden 2:1 situándose el Fab de CD3 en el extremo N-terminal. También se prepararon dos formatos monovalentes. El 1+1 de cabeza a cola tiene los restos de unión a FolR1:CD3 dispuestos en un orden 1:1 en el mismo brazo de la molécula, situándose el Fab de FolR1 en el extremo N-terminal. En el formato 1+1 clásico, los restos de unión a FolR1:CD3 están presentes una vez, cada uno en un brazo de la molécula. Para el clon 16D5 de la biblioteca de cadena ligera común no fue necesario el cruzamiento CH1Cκ. Estas moléculas biespecíficas se produjeron y purificaron de manera análoga al formato biespecífico de célula T invertido convencional.

Tabla 7: Resumen de rendimiento y contenido final de monómero de los diferentes formatos biespecíficos de célula T.

Construcción	**Monómero [%] (SEC)**	**Rendimiento**
TCB de FolR1 16D5 2+1 (invertido)	96 %	5,4 mg/l
TCB de FolR1 16D5 2+1 (clásico)	90 %	4,6 mg/l
TCB de FolR1 16D5 1+1 (cabeza a cola)	100 %	5,4 mg/l
TCB de FolR1 16D5 1+1 (clásico)	100 %	0,7 mg/l
TCB de FolR1 Mov19 2+1 (invertido)	98 %	3 mg/l
TCB de FolR1 Mov19 1+1 (cabeza a cola)	100 %	5,2 mg/l

Ejemplo 10

Caracterización bioquímica de moléculas de unión a FolR1 mediante resonancia de plasmón superficial

La unión de moléculas de unión a FolR1 como IgG o en el formato biespecífico de célula T a diferentes receptores de folato (FolR1, 2 y 3 humano, FolR1 murino y FolR1 de cinomolgo; todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES

0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

Inyecciones individuales

En primer lugar se analizaron las IgG anti-FolR1 mediante inyecciones individuales (Tabla 1) para caracterizar su reactividad cruzada (con FolR1 humano, murino y de cinomolgo) y su especificidad (para FolR1 humano, FolR2 humano, FolR3 humano). Se acoplaron directamente fusiones a Fc monoméricas de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) de ser humano, cinomolgo y murino o de receptor 2 y 3 de folato humano (FolR2-Fc, FolR3-Fc) sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG se inyectaron durante 60 segundos a una concentración de 500 nM. Las IgG que se unían a huFolR2 y a huFolR3 se rechazaron por falta de especificidad. La mayoría de las moléculas de unión solo tienen reactividad cruzada entre FolR1 humano y de cinomolgo, la reactividad cruzada a FolR1 murino adicional fue la mayoría de las veces de la mano con la pérdida de especificidad.

Tabla 8: Reactividad cruzada y especificidad de 25 nuevas moléculas de unión al receptor 1 de folato (como IgG) así como de dos IgG de control (Mov19 y farletuzumab). + significa unión, - significa sin unión, +/- significa unión débil.

Nombre del clon	**Unión a huFolR1**	**Unión a cyFolR1**	**Unión a muFolR1**	**Unión a huFolR2**	**Unión a huFolR3**
Mov19	+	+	-	-	-
Farletuzumab	+	+	-	-	-
16A3	+	+	+/-	-	-
18D3	+	+	-	-	-
19E5	+	+	+	+	+
19A4	-	-	+	+	+
15H7	+	+	+	-	-
15B6	+	+	-	-	-
16D5	+	+	-	-	-
15E12	+	+	+/-	+	+
21D1	+	+	+/-	-	-
16F12	+	+	-	-	-
21A5	+	+	-	-	+/-
21G8	+	+	-	+	+
19H3	-	-	+	-	-

Nombre del clon	Unión a huFolR1	Unión a cyFolR1	Unión a muFolR1	Unión a huFolR2	Unión a huFolR3
20G6	-	-	+	-	-
20H7	-	-	+	-	-
5D9	+	+	-	+	+
6B6	+	+	-	+	+
11F8	+	+	+	+	+
36F2	+	+	+	-	-
14E4	-	-	+	-	-

Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 9).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 2,1 a 500 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 600 segundos. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2-Fc biotinilada recombinante. Para el análisis de la interacción de la IgG 19H3 y el receptor 1 de folato murino, se añadió folato (Sigma F7876) en el tampón de ejecución HBS-EP a una concentración de 2,3µM. Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las IgG o moléculas biespecíficas de células T se aproximaron a una unión de Langmuir 1:1 y se ajustó con ese modelo (lo que no es correcto, pero que da una idea de la avidez). Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 9: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano y de cinomolgo.

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD aparente (M)
TCB 16D5	**huFolR1**	8,31E+04	3,53E-04	4,24E-09
	cyFolR1	1,07E+05	3,70E-04	3,45E-09
TCB 21A5	**huFolR1**	2,43E+05	2,64E-04	1,09E-09
	cyFolR1	2,96E+05	2,76E-04	9,32E-10
IgG 36F2	**huFolR1**	2,62E+06	1,51E-02	5,74E-9
	cyFolR1	3,02E+06	1,60E-02	5,31E-9
	muFolR1	3,7E+05	6,03E-04	1,63E-9
IgG Mov19	**huFolR1**	8,61E+05	1,21E-04	1,4E-10
	cyFolR1	1,29E+06	1,39E-04	1,08E-10
Farletuzumab	**huFolR1**	1,23E+06	9E-04	7,3E-10
	cyFolR1	1,33E+06	8,68E-04	6,5E-10
IgG 19H3	**muFolR1**	7,1E+05	1,1E-03	1,55E-09

1. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 10).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 6000-7000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 20 o 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (6,17 a 500 nM o 12,35 a 3000 nM) de fusión Fc-receptor 1 de folato humano o de cinomolgo en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 120 o 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 240 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 2,1 o pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa

informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 10: Unión monovalente (afinidad) de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano y de cinomolgo.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
TCB 16D5	**huFolR1**	1,53E+04	6,88E-04	4,49E-08
	cyFolR1	1,32E+04	1,59E-03	1,21E-07
TCB 21A5	**huFolR1**	1,79E+04	1,1E-03	6,16E-08
	cyFolR1	1,48E+04	2,06E-03	1,4E-07
IgG Mov19	**huFolR1**	2,89E+05	1,59E-04	5,5E-10
	cyFolR1	2,97E+05	1,93E-04	6,5E-10
Farletuzumab	**huFolR1**	4,17E+05	2,30E-02	5,53E-08
	cyFolR1	5,53E+05	3,73E-02	6,73E-08

2. Afinidad a CD3

La afinidad de la interacción entre las moléculas biespecíficas de células T anti-FolR1 y el CD3εδ-Fc humano recombinante se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 11).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 9000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (6,17 a 500 nM) de fusión CD3εδ-FC en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 240 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 2,1. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 11: Unión monovalente (afinidad) de moléculas biespecíficas de célula T

(TCB) de FolR1 a CD3-Fc humano.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
TCB 16D5	**huCD3**	4,25E+04	3,46E-03	8,14E-08
TCB 21A5	**huCD3**	3,72E+04	3,29E-03	8,8E-08

La parte de unión a CD3 es idéntica para todas las construcciones y la afinidad es similar para las moléculas biespecíficas de célula T medidas (intervalo de KD entre 60 y 90 nM).

Ejemplo 11

Moléculas biespecíficas de célula T de unión simultánea al receptor 1 de folato y a CD3

La unión simultánea de las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 al receptor 1 de folato y a CD3εδ-Fc humano recombinante se determinó mediante resonancia de plasmón superficial tal como se describe a continuación. Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 se inyectaron durante 60 s a 500 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo, seguido de una inyección de CDεδ-Fc humano durante 60 s a 500 nM. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2-Fc biotinilada recombinante. Las cuatro moléculas biespecíficas de célula T ensayadas (TCB 16D5, TCB 21A5, TCB 51C7 y TCB 45D2) fueron capaces de unirse simultáneamente al receptor 1 de folato y a CD3 humano, tal como se esperaba.

Ejemplo 12

Agrupamiento de epítopos

Para el agrupamiento de epítopos, las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T se inmovilizaron directamente sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare), con una respuesta final de aproximadamente 700 UR. Entonces se capturaron 500 nM de huFolR1-Fc durante 60 s, seguido de 500 nM de las diferentes moléculas de unión durante 30 s. La superficie se regeneró con dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 2

durante 30 s cada una. Se evaluó si las diferentes moléculas de unión podían unirse a huFolR1 capturado en las moléculas de unión inmovilizadas (Tabla 12).

Tabla 12: Caracterización de epítopos de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano. + significa unión, - significa sin unión, +/- significa unión débil

		Analitos en solución					
	En huFolR1	TCB 16D5	TCB 21A5		IgG 36F2	IgG Mov19	Farletuzumab
Inmovilizado	TCB 16D5	-	-		+	+	+
	TCB 21A5	-	-		+	+	+
	IgG 36F2	No es posible medir, huFolR1 se disocia demasiado rápidamente					
	IgG Mov19	+	+		-	-	-

Basándose en estos resultados y en datos adicionales con unión simultánea sobre huFolR1 inmovilizado, las moléculas de unión se separaron en dos grupos.. 16D5 y 21A5 parecen estar en el mismo grupo y Mov19, Farletuzumab (Coney et al., Cancer Res. 15 de noviembre de 1991;51(22):6125-32. Kalli et al., Curr Opin Investig Drugs. Dic 2007;8(12):1067-73) y 36F2 en otro (Tabla 13). Sin embargo, 36F2 se une a un epítopo distinto al de Mov19 y Farletuzumab ya que se une a FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Tabla 13: Agrupamiento de epítopos de moléculas de unión a FolR1 seleccionadas como IgG o moléculas biespecíficas de célula T (TCB) en FolR1 de humano

Epítopo 1		Epítopo 3
16D5		Mov19
21A5		Farletuzumab
		36F2

Ejemplo 13

Selección de moléculas de unión

Las moléculas de unión a FolR1 en los formatos IgG se exploraron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) y mediante ensayo *in vitro* en células para seleccionar los mejores candidatos.

Las IgG anti-FolR1 se analizaron mediante SPR para caracterizar su reactividad cruzada (con FolR1 humano, murino y de cinomolgo) y la especificidad (para FolR1 humano, FolR2 humano, FolR3 humano). La unión no específica a FolR2 y 3 humano se consideró como un factor de exclusión. La unión y especificidad por FolR1 humano se confirmó en células. Algunas moléculas de unión no se unieron a células que expresaban FolR1 aunque reconociesen a FolR1 humano recombinante en SPR. Se determinó la temperatura de agregación pero no fue un factor de exclusión ya que las moléculas de unión eran todas estables. Las moléculas de unión seleccionadas se ensayaron en un ELISA de polirreactividad para comprobar la unión no específica, lo que dio lugar a la exclusión de cuatro moléculas de unión. Este proceso dio como resultado una selección inicial de dos moléculas de unión: 36F2 (biblioteca de Fab), y 16D5 (cadena ligera común). 36F2 se disoció rápidamente de huFolR1 y, por lo tanto, no se favoreció inicialmente.

Ejemplo 14

Unión específica de moléculas de unión a FolR1 recién generadas a células tumorales positivas a FolR1 humano

Se generaron nuevas moléculas de unión a FolR1 mediante presentación en fagos usando bien una biblioteca de Fab o una biblioteca de cadena ligera común usando la cadena ligera de CD3. Las moléculas identificadas se convirtieron a un formato de IgG1 humana y se abordó la unión a células HeLa con alta expresión de FolR1. Se incluyó la molécula de unión a FolR1 humano, Mov19, como molécula de referencia. La mayoría de las moléculas de unión ensayadas en este ensayo mostraron unión de inmediata a buena a FolR1, uniéndose algunos clones igual de bien que Mov19

(véase la Figura 2). Los clones 16A3, 18D3, 15H7, 15B6, 21D1, 14E4 y 16F12 se excluyeron porque la unión a FolR1 en células no pudo confirmarse mediante citometría de flujo. En una etapa posterior, los clones seleccionados se ensayaron respecto de la especificidad por FolR1 humano excluyendo la unión a FolR2 humano estrechamente relacionado. Se transfectaron de manera transitoria células HEK con FolR1 humano o FolR2 humano para abordar la especificidad. El clon 36F2 procedente de la biblioteca de Fab y los clones 16D5 y 21A5 procedentes de la biblioteca de CLC se unen específicamente a FolR1 humano y no a FolR2 humano (véanse las figuras 3A-B). Todos los demás clones ensayados mostraron al menos cierta unión a FolR2 humano (véanse las figuras 3A-B). Por lo tanto, estos clones se excluyeron de posteriores caracterizaciones. En paralelo, se abordó la reactividad cruzada de los clones de FolR1 a FolR1 de cinomolgo efectuando estudios de unión en células HEK transfectadas transitoriamente con FolR1 de cinomolgo. Todos los clones ensayados son capaces de unirse a FolR1 de cinomolgo y los tres clones específicos de FolR1 humano seleccionados, 36F2, 16D5 y 21A5 se unen bien de manera comparable a FoLR1 humano y de cinomolgo (figura 4). Posteriormente se convirtieron tres moléculas de unión a FolR1 humano con reactividad cruzada con cinomolgo a formato TCB y se ensayaron respecto de la inducción de eliminación por células T y activación de células T. Estos clones fueron 16D5 y 21A5 de la biblioteca de CLC. Como molécula de referencia, se incluyó el TCB de FolR1, Mov19, en todos los estudios. Estos TCB de FolR1 se usaron entonces para comparar la inducción de la internalización después de la unión a FolR1 en células HeLa. Los tres clones ensayados se internalizaron tras la unión a FolR1, comparable a la internalización tras la unión del TCB de FolR1, Mov19 (figura 5). Se dejó de usar el TCB de FolR1 21A5 debido a signos de polirreactividad.

Ejemplo 15

Eliminación mediada por células T de células diana tumorales que expresaban FolR1 mediante anticuerpos TCB de FolR1

Los TCB de FolR1 se usaron para determinar la eliminación de células tumorales que expresaban FolR1 mediada por células T. Se usó un panel de líneas celulares diana potenciales para determinar los sitios de unión a FolR1 mediante análisis Qifikit.

El panel de células tumorales usado contiene células tumorales con elevada, intermedia y baja expresión de FolR1 y una línea celular negativa a FolR1.

Tabla 14: Sitios de unión a FolR1 en células tumorales

Línea celular	Origen	Sitios de unión a FolR1
Hela	Adenocarcinoma de cuello de útero	2’240’716
Skov3	Adenocarcinoma de ovario	91’510
OVCAR5	Adenocarcinoma de ovario	22’077
HT29	Adenocarcinoma colorrectal	10’135
MKN45	Adenocarcinoma gástrico	54

La unión de los dos diferentes TCB de FolR1 (que contenían las moléculas de unión 16D5 y Mov19) a este panel de líneas celulares tumorales se determinó mostrando que los TCB de FolR1 se unen específicamente a células tumorales que expresan FolR1 y no a una línea celular tumoral negativa a FolR1. La cantidad de construcción unida es proporcional al nivel de expresión de FolR1 y sigue habiendo buena unión detectable a la línea celular HT-29 baja en FolR1. Además, no hay unión del TCB DP47 de control negativo en cualquiera de las líneas celulares usadas (figuras 6A-E).

La línea celular de expresión intermedia, SKOV3, y la línea celular de baja expresión, HT-29, se usaron posteriormente para ensayar la eliminación mediada por células T y la activación de células T usando el TCB 16D5; Se incluyó el TCB DP47 como control negativo. Ambas líneas celulares se eliminaron en presencia de niveles muy bajos de TCB 16D4. La eliminación general de células SKOV3 fue mayor en comparación con HT-29, lo que refleja los mayores niveles de expresión de FolR1 en células SKOV3 (figuras 7A-D). En línea con esto, se detectó una fuerte regulación positiva de los marcadores de activación CD25 y CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$. La activación de células T fue muy similar en presencia de células SKOV3 y células HT-29. El control negativo, TCB DP47 no induce eliminación a las concentraciones usadas y no hubo una regulación positiva significativa de CD25 y CD69 en células T.

Tabla 15: Valores de CE50 de eliminación de células tumorales y de activación de células T con células SKOV3

Construcción	**Eliminación a las 24 h**	**Eliminación a las 48 h**	**CD4+ CD69+ (%)**	**CD4+ CD25+ (%)**	**CD8+ CD69+ (%)**	**CD8+ CD25+ (%)**

	(pM)	(pM)				
TCB de FolR1 16D5	0,7	0,04	0,34	0,33	0,025	0,031

Tabla 16: Valores de CE50 de eliminación de células tumorales y de activación de células T con células HT-29

Construcción	**Eliminación a las 24 h (pM)**	**Eliminación a las 48 h (pM)**	**CD4+ CD69+ (%)**	**CD4+ CD25+ (%)**	**CD8+ CD69+ (%)**	**CD8+ CD25+ (%)**
TCB de FolR1 16D5	2,8	0,1	0,69	0,62	0,021	0,028

Ejemplo 16

Unión a eritrocitos y activación de células T en sangre completa

Para probar que no hay activación espontánea en ausencia de células tumorales que expresan FolR1 se ensayó si hay unión de los clones de FolR1 a eritrocitos, que potencialmente pueden expresar FolR1. No se pudo observar unión específica de la IgG 16D5 y de la IgG Mov19 a eritrocitos, se incluyó la IgG DP47 como control negativo (figura 8).

Para excluir cualquier unión no específica adicional a células sanguíneas o activación no específica a través de TCB de FolR1, se añadieron el TCB 16D5 y el TCB Mov19 en sangre completa y se analizó la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ mediante citometría de flujo. Se incluyó el TCB DP47 como control negativo. No pudo observarse activación de células T con ninguna de las construcciones ensayadas analizando la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ (figura 9).

Ejemplo 19

Expresión de FolR1 en células epiteliales primarias

FolR1 se expresa a bajo nivel en células epiteliales primarias. En el presente documento se intentó probar si estos niveles son suficientes para inducir eliminación mediada por células T en presencia de los TCB de FolR1. Para comprobar esto se usaron células epiteliales bronquiales humanas primarias, células epiteliales del plexo coroide humano primarias, células epiteliales corticales renales humanas primarias y células epiteliales pigmentarias retinales humanas primarias. Como control positivo se incluyeron células SKOV3 o HT-29 positivas a FolR1. En primer lugar se verificó la expresión de FolR1 en las células primarias usadas y se determinó la cantidad de sitios de unión a FolR1 en estas células. Las células epiteliales bronquiales, las células epiteliales corticales renales y las células epiteliales pigmentarias retinales expresan niveles muy bajos pero significativos de FolR1 en comparación con los niveles expresados en células tumorales. Las células epiteliales del plexo coroide no expresan niveles significativos de FolR1.

Tabla 18: Sitios de unión a FolR1 en células epiteliales primarias

Línea celular	**Sitios de unión**
Epitelio bronquial	492
Epitelio del plexo coroide	104
Epitelio cortical renal	312
Epitelio pigmentario retinal	822
Skov3	69’890

Las células epiteliales primarias que mostraron expresión de FolR1 en su superficie

se usaron para abordar la cuestión de si estas células pueden eliminarse por células T en presencia de los TCB de FolR1. No pudieron medirse niveles significativos de eliminación pero se detectó activación de células T en presencia de células epiteliales pigmentarias retinales, células epiteliales bronquiales y células corticales renales, dando como resultado la regulación positiva de CD25 y CD69. La activación más fuerte se observa con células epiteliales pigmentarias retinales, dando como resultado una regulación positiva de CD25 y CD69 tanto en células T $CD4^+$ como en células T $CD8^+$. En presencia de células epiteliales bronquiales se induce una menor activación de células T con la regulación positiva de CD69 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ pero una regulación positiva muy baja de CD25 solo en células T $CD4^+$ pero no en células T $CD8^+$. Se obtiene la menor activación de células T en presencia de células epiteliales renales sin regulación positiva de CD25 en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ y CD69 solo se regula positivamente en células T $CD8^+$ (figuras 12A-X).

Ejemplo 20

Comparación de diferentes formatos de TCB que contienen molécula de unión 16D5

Para determinar si el formato invertido 2+1 de TCB es el formato más activo con la molécula de unión a FolR1 seleccionada, se produjeron diferentes formatos que contenían 16D5 y se compararon respecto de la unión a célula diana, eliminación mediada por células T y activación de células T. La molécula de unión 16D5 se ensayó en el formato invertido 2+1 de TCB (fig. 1A), clásico 2+1 de TCB (fig. 1D), clásico 1+1 de TCB (fig. 1C) y cabeza a cola 1+1 de TCB (fig. 1B).

Todas las construcciones se ensayaron respecto de la unión a FolR1 en células HeLa. Las moléculas bivalentes respecto de la unión a FolR1 se unen más fuerte en comparación con las construcciones monovalentes debido a la avidez. La diferencia entre las construcciones bivalentes frente a las monovalentes es más pronunciada para 16D5. El motivo puede ser que debido a la menor afinidad de 16D5 el efecto de avidez para esta molécula de unión es más fuerte. Entre los dos TCB 1+1 no hay diferencia significativa en la unión pero hay una diferencia entre las dos construcciones 2+1. La construcción invertida 2+1 se une con más fuerza a FolR1 que la construcción clásica 2+1. Esto indica que en la construcción 2+1 clásica la unión a FolR1 está influenciada por la presencia del Fab de CD3 mientras que en la construcción invertida la unión está menos influenciada.

Al ensayar la eliminación mediada por células T con estas construcciones se pudo demostrar que la unión más fuerte del TCB invertido 2+1 se convierte en una

eliminación de células tumorales y una activación de células T más fuerte en comparación con el TCB clásico 2+1. El TCB clásico 2+1 de FolR1 16D5 es solo un poco más activo que la construcción de cabeza a cola 1+1 respectiva. La construcción de cabeza a cola 1+1 es significativamente más activa que la construcción clásica 1+1. Esto no refleja la situación observada en la unión y puede deberse a una mejor reticulación con la construcción de cabeza a cola. La eliminación de células tumorales y la activación de células T general es comparable con todas las construcciones ensayadas, las diferencias en cuanto a la potencia observada con las diferencias están únicamente en términos de valores de CE50. En general, puede concluirse que TCB invertido 2+1 de FolR1 independientemente de la molécula de unión usada es el formato preferido para inducir eliminación de células tumorales mediada por células T y activación de células T (véase la fig. 13A-C y la fig. 14A-C).

Tabla 19 Valores de CE50 de unión a células diana y de eliminación mediada por células T con diferentes formatos de TCB

Construcción	**CE50 de unión (nM)**	**Eliminación a las 24 h (pM)**	**Eliminación a las 48 h (pM)**
TCB invertido 2+1 de FolR1 16D5	11,03	1,43	0,18
TCB clásico 2+1 de FolR1 16D5	17,07	5,60	2,18
TCB clásico 1+1 de FolR1 16D5	107,3	n.d.	n.d.
TCB cabeza a cola 1+1 de FolR1 16D5	102,6	26,24	6,06

Tabla 20 Valores de CE50 de activación de células T en presencia de células SKOV3 con diferentes formatos de TCB

Construcción	CD4+CD25+ (%)	CD4+CD69+ (%)	CD8+CD25+ (%)	CD8+CD69+ (%)
TCB invertido 2+1 de FolR1 16D5	1,96	0,33	2,10	n.d.
TCB clásico 2+1 de FolR1 16D5	13,83	3,67	12,88	4,47
TCB clásico 1+1 de FolR1 16D5	38,54	n.d.	n.d.	n.d.
TCB cabeza a cola 1+1 de FolR1 16D5	17,14	7,47	25,15	n.d.

Ejemplo 21

Líneas de células tumorales y células primarias

Las células HeLa (CCL-2) se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en DMEM con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células SKOV3 (HTB-77) se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en RPMI con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células OVCAR5 se obtuvieron del NCI y se cultivaron en RPMI con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células HT-29 (ATCC-299) se obtuvieron del DSMZ y se cultivaron en medio 5A de McCoy con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, las células MKN-45 (ACC-409) se obtuvieron del DSMZ y se cultivaron en RPMI con FCS al 10 % y glutamina 2 mM.

Todas las células epiteliales primarias se obtuvieron de ScienCell Research Laboratories. Las células de epitelio bronquial humano (HBEpiC, número de catálogo 3210 se cultivaron en medio de células epiteliales bronquiales (BEpiCM, n.º de cat. 3211, ScienCell). Las células epiteliales colónicas humanas (HCoEpiC), número de catálogo 2950 se cultivaron en medio de células epiteliales colónicas

(CoEpiCM, n.º de cat. 2951, ScienCell). Las células epiteliales pigmentarias retinales humanas (HRPEpiC), número de catálogo 6540 se cultivaron en medio de células epiteliales (EpiCM, n.º de cat. 4101, ScienCell). Las células epiteliales corticales renales humanas (HRCEpiC), número de catálogo 4110, se cultivaron en medio de células epiteliales (EpiCM, n.º de cat. 4101, ScienCell). Las células epiteliales del plexo coroide humanas (HCPEpiC), número de catálogo 1310 se cultivaron en medio de células epiteliales (EpiCM, n.º de cat. 4101, ScienCell).

Ejemplo 22

Unión a diana mediante citometría de flujo

Las células diana indicadas se recogieron con tampón de disociación celular, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de FACS. La tinción con anticuerpo se efectuó en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Posteriormente se sembraron 200.000 células por pocillo. La placa se centrifugó durante 4 min a 400 g y se retiró el sobrenadante. Los anticuerpos de ensayo se diluyeron en tampón de FACS y se añadieron 20 µl de la solución de anticuerpo a las células durante 30 min a 4 °C. Para eliminar el anticuerpo no unido las células se lavaron dos veces con tampón de FACS antes de la adición del anticuerpo secundario diluido (fragmento $F(ab')_2$ de cabra anti-IgG humana AffiniPure conjugado a FITC, fragmento Fcg, Jackson ImmunoResearch n.º 109-096-098 o fragmento $F(ab')_2$ de cabra anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE específico de fragmento Fcg, Jackson ImmunoResearch n.º 109-116-170. Después de 30 min de incubación a 4 °C el anticuerpo secundario no unido se eliminó mediante lavado. Antes de medir las células se resuspendieron en 200 µl de tampón de FACS y se analizaron mediante citometría de flujo usando un dispositivo BD Canto II o BD Fortessa.

Ejemplo 23

Internalización

Se recogieron las células y se determinó la viabilidad. Las células se resuspendieron en medio frío reciente a 2 millones de células por ml y la suspensión de células se transfirió a un tubo falcon de 15 ml para cada anticuerpo. Los anticuerpos que se iban a ensayar para internalización se añadieron con una concentración final de 20 µg por ml a las células. Los tubos se incubaron durante 45 min en la sala fría sobre un agitador. Después de la incubación las células se lavaron tres veces con PBS frío para eliminar los anticuerpos no unidos. Se transfirieron 0,2 millones de células a la placa de FACS en el instante cero. Las células marcadas se resuspendieron en medio templado y se incubaron a 37 °C. En los instantes indicados se transfirieron 0,2 millones de células por pocillo en PBS frío, se lavaron emplacadas en la placa de FACS. Para detectar las construcciones que permanecían sobre la superficie se

tiñeron las células con anticuerpo secundario anti-Fc humano marcado con PE. Posteriormente se añadieron 20 µl del anticuerpo diluido por pocillo y se incubó la placa durante 30 min a 4 °C. Después se lavaron dos veces las células para eliminar los anticuerpos no unidos y después se fijaron con FPA al 1 % para evitar cualquier internalización adicional. La fluorescencia se midió usando un dispositivo BD FACS CantoII.

Ejemplo 24

Análisis QIFIKIT®

QIFIKIT® contiene una serie de perlas, de 10 µm de diámetro y recubiertas con diferentes cantidades bien definida de moléculas de Mab de ratón (anti-CD5 humano de alta afinidad, Clon CRIS-1, isotipo IgG2a). Las perlas imitan a células con diferentes densidades de antígeno que se han marcado con un Mab primario de ratón, isotipo IgG. En resumen, las células se marcaron con anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido contra el antígeno de interés. En un pocillo de ensayo separado, las células se marcaron con anticuerpo monoclonal de ratón irrelevante (control de isotipo). Entonces, las células, las perlas de preparación y las perlas de calibración se marcaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fluoresceína incluido en el kit. El anticuerpo primario usado para marcar las células tiene que usarse a una concentración saturante. El anticuerpo primario puede ser de cualquier isotipo de IgG de ratón. En estas condiciones, el número de moléculas de anticuerpo primario unidas corresponde al número de sitios antigénicos sobre la superficie celular. El anticuerpo secundario se usa también a concentración saturante. Por consiguiente, la fluorescencia está relacionada con el número de moléculas de anticuerpo primario unida sobre las células y sobre las perlas.

Ejemplo 25

Eliminación de células tumorales mediada por células T y activación de células T

Las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se contaron y se comprobó la viabilidad. Las células se resuspendieron en sus medios respectivos con una concentración final de 300.000 células por ml. Después se transfirieron 100 µl de la suspensión de células diana en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano. La placa se incubó durante toda la noche a 37 °C en el incubador para permitir la adherencia de las células a la placa. Al día siguiente se aislaron PBMC de sangre completa de donantes sanos. La sangre se diluyó a 2:1 con PBS y se dispuso sobre 15 ml de Histopaque-1077 (n.º 10771, Sigma-Aldrich) en tubos Leucosep y se centrifugó durante 30 min a 450 g sin freno. Después de la centrifugación se recogió la banda que contenía las células con una pipeta de 10 ml y se transfirió a tubos de 50 ml. Los tubos se enrasaron con PBS a 50 ml y se

centrifugaron (400 g, 10 min, temperatura ambiente). El sobrenadante se retiró y se resuspendió el sedimento en PBS. Después de la centrifugación (300 g, 10 min, temperatura ambiente), se descartaron los sobrenadantes, se agruparon 2 tubos y se repitió la etapa de lavado (esta vez centrifugación a 350 g, 10 min, temperatura ambiente). Posteriormente se resuspendieron las células y se agruparon los sedimentos en 50 ml de PBS para el recuento de células. Después del recuento se centrifugaron las células (350 g, 10 min, temperatura ambiente) y se resuspendieron a 6 millones de células por ml en RPMI con FCS al 2 % y glutamina 2 nM. Se retiró el medio de las células diana emplacadas y se añadieron también los anticuerpos diluidos en RPMI con FCS al 2 % y glutamina 2 nM. Se transfirieron 300.000 células de la solución de células efectoras a cada pocillo dando como resultado una relación E:T de 10:1. Para determinar la liberación máxima se lisaron las células con Triton X-100. La liberación de LDH se determinó tras 24 h y 48 h usando el kit de detección de citotoxicidad (n.º 1644793, Roche Applied Science). La regulación positiva de marcadores de activación en células T después de la eliminación de células tumorales se midió mediante citometría de flujo. En resumen, se recogieron PBMC, se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se tiñeron con anticuerpos CD4 PE-Cy7 (n.º 3557852, BD Bioscience), CD8 FITC (n.º 555634, BD Bioscience), CD25 APC (n.º 555434, BD Bioscience), CD69 PE (n.º 310906, BioLegend) diluidos en tampón de FACS. Después de 30 min de incubación a 4 °C se lavaron las células dos veces con tampón de FACS. Antes de medir la fluorescencia usando el dispositivo BD Canto II se resuspendieron las células en 200 µl de tampón de FACS.

Ejemplo 26

Activación de células T en sangre completa

Se añadieron 280 µl de sangre fresca a una placa cónica profunda de 96 pocillos. Después se añadieron 20 µl de los TCB diluidos a la sangre y se mezcló bien agitando la placa. Después de 24 h de incubación a 37 °C en un incubador se mezcló la sangre y se transfirieron 35 µl a una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Después se añadieron 20 µl de la mezcla de tinción de anticuerpo que consistía en CD4 PE-Cy7 (n.º 3557852, BD Bioscience), CD8 FITC (n.º 555634, BD Bioscience), CD25 APC (n.º 555434, BD Bioscience), CD69 PE (n.º 310906, BioLegend) y CD45 V500 (n.º 560777, BD Horizon) y se incubaron durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Antes de medir se añadieron 200 µl de la solución de lisis BD FACS recién preparada (n.º 349202, BD FACS) a la sangre. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente las células se midieron con un dispositivo BD Fortessa.

Ejemplo 27

Estudio FCDU (farmacocinético de dosis única) de TCB de FOLR1 humanizado (clon 16D5) en ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) inmunodeficientes

Se mantuvo a ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) hembra, de 6-7 semanas de edad al comienzo del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) en condiciones libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (P2011/128). Tras la llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

Se inyectó a los ratones por vía i.v. 10/1/0,1 µg/ratón de TCB de FolR1 y se extrajo sangre de 3 ratones por grupo e instante. Se inyectó a todos los ratones un volumen total de 200 µl de la solución adecuada. Para obtener la cantidad adecuada del TCB de FolR1 por cada 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. Se recogieron muestras de suero a los 5 min, 1h, 3h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h y 168h después de la inyección de la terapia.

La figura 15 muestra que el TCB de FolR1 16D5 muestra propiedades FC similares a IgG típicas y proporcionales a la dosis en ratones NOG con una baja eliminación.

Tabla 21: Condiciones experimentales.

Compuesto	**Dosificación**	**Tampón de formulación**	**Concentración (mg/ml)**
TCB de FolR1 (16D5)	10 µg (correspondientes a aprox. 0,5 mg/kg)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,43 (= solución madre)
TCB de FolR1 (16D5)	1 µg (correspondientes a aprox. 0,05 mg/kg)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,43 (= solución madre)
TCB de FolR1 (16D5)	0,1 µg (correspondientes a aprox. 0,005 mg/kg)	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	5,43 (= solución madre)

Ejemplo 28

Eficacia *in vivo* de TCB de FolR1 (clon 16D5) después de la transferencia de PBMC humanos en ratones NOG portadores de Skov3

El TCB de FolR1 se ensayó en la línea celular de carcinoma de ovarios Skov3, inyectada por vía s.c. en ratones NOG a los que se les ha injertado PBMC.

Las células de carcinoma de ovario Skov3 se obtuvieron de la ATCC (HTB-77). La línea celular de tumor se cultivó en RPMI que contenía FCS al 10 % (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO_2 al 5 %. El pase 35 se usó para trasplante, a una viabilidad > 95 %. Se inyectaron 5 x 10^6 células por animal por vía s.c. en el flanco derecho de los animales en un total de 100 µl de medio de cultivo celular RPMI (Gibco).

Se mantuvo a ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) hembra, de 6-7 semanas de edad al comienzo del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) en condiciones libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (P2011/128). Tras la llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

De acuerdo con el protocolo (figura 16), se inyectó a los ratones por vía s.c. en el día 0 del estudio con 5 x 10^6 células Skov3. En el día 21 del estudio, se aislaron PBMC humanos de un donante sano mediante el método de Ficoll y se inyectaron 10 x 10^6 células por vía i.p. en los ratones portadores de tumores. Dos días después, se aleatorizó a los ratones y se distribuyeron homogéneamente en cinco grupos de tratamiento (n = 12) seguido de inyección por vía i.v. con 10/1/0,1 µg/ratón del TCB de FolR1 o 10 µg/ratón del TCB de control DP47 una vez a la semana durante tres semanas. Se inyectaron a todos los ratones 200 µl de la solución adecuada. Se inyectó a los ratones en el grupo de vehículo con PBS. Para obtener la cantidad adecuada de TCB por cada 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. El crecimiento tumoral se midió una vez a la semana usando un calibre (figura 17) y se calculó el volumen tumoral del modo siguiente:

V_T: (A^2/2) x L *(A: Anchura L: Longitud)*

La inyección semanal del TCB de FolR1 dio como resultado un efecto antitumoral dependiente de la dosis. Una dosis de 10 µg/ratón y de 1 µg/ratón indujo reducción del tumor y de 0,1 µg/ratón estasis tumoral (figura 17, tabla 22). La reducción tumoral máxima se logró a una dosis de 10 µg/ratón en comparación con el TCB DP47 de control no dirigido.

Tabla 22: Eficacia *in vivo*.

Compuesto	**Dosificación**	**Inhibición del crecimiento tumoral**
TCB de control TCB DP47	10 µg (correspondientes a aprox. 0,5 mg/kg)	7 %
TCB de FolR1 (16D5)	10 µg (correspondientes a aprox. 0,5 mg/kg)	90 %
TCB de FolR1 (16D5)	1 µg (correspondientes a aprox. 0,05 mg/kg)	74 %
TCB de FolR1 (16D5)	0,1 µg (correspondientes a aprox. 0,005 mg/kg)	56 %

Para las lecturas FD, se sacrificó a tres ratones por grupo de tratamiento en el día 32 del estudio, se extirparon los tumores y se prepararon suspensiones de células individuales mediante una digestión enzimática con colagenasa V, dispasa II y DNasa para su posterior análisis FACS (figura 19 y 20). Las células individuales se usaron bien directamente para la tinción de antígenos extracelulares y de marcadores de activación o se volvieron a estimular usando PMA a 5 ng/ml e ionomicina a 500 ng/ml en presencia del inhibidor del transporte de proteínas Monensina durante 5 h en medio de cultivo normal. Después de volver a estimular, se tiñeron las células para antígenos de superficie, seguido de una etapa de fijación y permeabilización. Las muestras fijadas se tiñeron entonces intracelularmente para TNF-□□IFN-□□IL-10 e IL-2 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se usó el mismo procedimiento para la desgranulación de las células, pero se añadió un anticuerpo anti-CD107a durante el periodo de reestimulación y las muestras fijadas se tiñeron para el contenido intracelular de perforina y granzima B. El análisis FACS reveló números estadísticamente más altos de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en el tejido tumoral tras el tratamiento con TCB de FolR1 en comparación con el control de vehículo y TCB de control no dirigido. Además, se detectaron números mayores de células T productoras de TNF-, IFN- e IL-2 así como perforina$^+$/granzima-B$^+$ $CD4^+$ y $CD8^+$ en los tumores tratados con TCB de FOLR1. Las células T que se infiltraban en tumores tratadas con TCB de FolR1 también mostraron mayores tasas de desgranulación en comparación con los grupos de control.

En el día 38 de terminación del estudio, se sacrificó a todos los animales; se extirparon los tumores y se pesaron (figura 18). El peso de los tumores tratados con 10 y 1 µg/ratón del TCB de FOLR1 mostraron una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos de control.

Tabla 23: Condiciones experimentales.

Compuesto	**Dosificación**	**Tampón de formulación**	**Concentración (mg/ml)**
PBS			
TCB de FolR1 (16D5)	10 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,88 (= solución madre)
TCB de FolR1 (16D5)	1 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,88 (= solución madre)
TCB de FolR1 (16D5)	0,1 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	3,88 (= solución madre)
TCB DP47	10 µg	Histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0	4,35 (= solución madre)

Ejemplo 29

Generación de un anticuerpo biespecífico kappa-lambda de FolR1/CD3

Para generar un anticuerpo biespecífico (monovalente para cada antígeno) que pueda unirse simultáneamente a CD3 humano y al receptor alfa de folato humano (FolR1) sin usar ninguna estrategia de heterodimerización (por ejemplo, la tecnología de pomo en agujero), se aplicó una combinación de una biblioteca de cadena ligera común con la tecnología denominada CrossMab; La región variable de las moléculas de unión a CD3 humanizadas (CH2527_VL7_46/13) se fusionó al dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano convencional para formar la molécula cruzada VLVH (fusionada a Fc) que es común para ambas especificidades. Para generar los homólogos cruzados (VHCL), se fusionó un dominio variable de cadena pesada específico de CD3 (CH2527_VH_23/12) a una cadena ligera □ humana constante mientras que un dominio variable de cadena pesada específico para FolR1 (clon 16D5, aislado de una biblioteca de cadena ligera común) se fusionó a una cadena

ligera □ humana constante. Esto permite la purificación del anticuerpo biespecífico deseado aplicando etapas posteriores de purificación con columnas KappaSelect y LambdaFabSelect (GE Healthcare) para eliminar los anticuerpos homodiméricos no deseados.

Todos los vectores de expresión de anticuerpo se generaron usando tecnología de ADN recombinante convencional tal como se describe en Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los genes o los fragmentos génicos se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o se generaron a partir de oligonucleótidos sintéticos en Geneart AG (Regensburg, Alemania) mediante síntesis génica automatizada. Los fragmentos de ADN amplificados mediante la PCR o subclonados se confirmaron mediante secuenciación de ADN (Synergene GmbH, Suiza). El ADN de plásmido se transformó y amplificó en células hospedadoras de *E. coli* adecuadas para la preparación de ADN de plásmido de grado de transfección usando kits Maxiprep convencionales (Qiagen). Para la producción de las moléculas biespecíficas se transfectó a células HEK293 EBNA con plásmidos que codificaban los genes respectivos usando un método basado en polietilenimina (PEI) convencional. La relación de plásmido usada de los tres vectores de expresión fue 1:1:1. Las células transfectadas se cultivaron durante 7 días antes de recoger los sobrenadantes para su purificación. Los anticuerpos biespecíficos kappa-lambda de FolR1/CD3 se produjeron y purificaron del modo que sigue.

1. Transfección y producción transitoria

El anticuerpo biespecífico kappa-lambda se produjo de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añadieron 160 ml de medio F17 y las

células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadieron ácido valproico 1 mM y alimentación 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recogió el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

2. Purificación

El anticuerpo biespecífico kappa-lambda se purificó en tres etapas usando una etapa de afinidad específica para las cadenas ligeras kappa, seguida de una etapa de afinidad específica para las cadenas ligeras lambda y finalmente mediante una etapa de cromatografía de exclusión por tamaños para retirar los agregados. El sobrenadante obtenido a partir de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando Tris 2 M, pH 8,0) y se aplicó a una matriz de afinidad de kappa Capture Select, o HiTrap KappaSelect, GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 1 ml, equilibrada con 5 volúmenes de columna (cv) de tampón A (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0). Después de lavar con 15 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,0) en 25 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó el pH de la solución a pH 8,0 (usando Tris 2 M, pH 8,0). Las fracciones neutralizadas agrupadas se aplicaron a una matriz de afinidad de lambda Capture Select (en este caso: HiTrap LambdaFabSelect, GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 1 ml) equilibrada con 5 volúmenes de columna (vc) de tampón A (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0). Después de lavar con 15 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (Tris 50 mM, glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,0) en 25 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó el pH de la solución a pH 8,0 (usando Tris 2 M, pH 8,0). Esta solución se concentró usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius) y posteriormente se aplicaron a una columna Superdex^{TM} 200 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. Las fracciones agrupadas después de la exclusión por tamaño se concentraron de nuevo usando ultraconcentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius).

La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Solo se pudieron purificar pequeñas cantidades de proteína con un rendimiento final de 0,17 mg/l.

Ejemplo 30

Eliminación mediada por células T con anticuerpo biespecífico kappa-lambda de FolR1/CD3

La actividad del TCB de FolR1 kappa lambda se ensayó en células SKOV3 en presencia de PBMC recién aislados. Como control negativo se incluyó TCB DP47. La eliminación de células SKOV3 mediada por células T se determinó tras 24 h y 48 h mediante liberación de LDH. Después de 48 h las células T se recogieron y se midió la regulación positiva de CD69 y CD25 en células T CD4 y células T CD8 mediante citometría de flujo.

La construcción de FolR1 kappa lambda induce la eliminación de células SKOV3 de una manera dependiente de la concentración que se acompaña de regulación positiva de CD69 y CD25 tanto en células T CD4 como en células T CD8.

Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Tras 24 h y 48 h se determinó la eliminación de células tumorales midiendo la liberación de LDH (Fig. 21). Se incubaron células SKOV3 con PBMC en presencia de kappa lambda TCB de FolR1 o TCB de DP47. Después de 48 h se midió la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD4 y células T CD8 mediante citometría de flujo (Fig. 22).

Ejemplo 31

Caracterización bioquímica de moléculas de unión a FolR1 16D5 y 36F2 mediante resonancia de plasmón superficial

La unión de 16D5 anti-FolR1 en diferentes formatos biespecíficos de célula T monovalentes o bivalentes y de 36F2 anti-FolR1 como IgG o como biespecífico de célula T al receptor 1 de folato recombinante humano, de cinomolgo y murino (todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, GE Healthcare).

1. Moléculas ensayadas

Las moléculas usadas para la determinación de la afinidad y la avidez se describen en la tabla 24.

Tabla 24: Nombre y descripción de las 6 construcciones usadas en el análisis mediante SPR

Nombre	Descripción
TCB 16D5	formato invertido, biespecífico de célula T 2+1 (cadena ligera común)
TCB 16D5 clásico,	formato clásico, biespecífico de célula T 2+1 (cadena ligera común)
TCB 16D5 1+1	biespecífico de célula T 1+1 (cadena ligera común)
TCB 16D5 1+1 HT	cabeza a cola biespecífico de célula T 1+1 (cadena ligera común)
IgG 36F2	IgG1 humana con P329G LALA
TCB 36F2	crossfab, formato invertido, biespecífico de célula T 2+1

2. Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 25).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, GE Healthcare). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 3,7 a 900 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 240 o 600 segundos. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 30 s de glicina-HCl 10 mM pH 2. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de CD134 murino-Fc biotinilada

recombinante. Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las IgG o de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). Para las moléculas biespecíficas de célula T de formato 1+1 la interacción es realmente 1:1 y la KD representa la afinidad ya que hay solo una molécula de unión a FolR1 en esta construcción.

Tabla 25: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de 16D5 y 36F2 como IgG anti-FolR1 o como moléculas biespecíficas (TCB) en FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
IgG 36F2	**huFolR1**	2,07E+06	1,3E-02	6 nM
	cyFolR1	2,78E+06	1,75E-02	6 nM
	muFolR1	4,28E+05	8,23E-04	2 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	2,45E+06	9,120E-03	4 nM
	cyFolR1	4,31E+06	1,45E-02	3 nM
	muFolR1	6,97E+05	9,51E-04	1 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	1,57E+05	3,92E-04	3 nM
	cyFolR1	2,01E+05	3,81E-04	2 nM
TCB 16D5 clásico,	**huFolR1**	2,04E+05	1,84E-04	0,9 nM
	cyFolR1	2,50E+05	3,05E-04	1 nM
TCB 16D5 1+1 HT	**huFolR1**	5,00E+04	2,25E-03	45 nM
	cyFolR1	5,75E+04	4,10E-03	70 nM
TCB 16D5 1+1	**huFolR1**	3,65E+04	2,04E-03	56 nM
	cyFolR1	4,09E+04	3,60E-03	90 nM

3. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 26).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 12000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,3 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano, de cinomolgo o murino a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 26: Unión monovalente (afinidad) de 16D5 y 36F2 como IgG anti-FolR1 o como moléculas biespecíficas (TCB) en FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
IgG 36F2	**huFolR1**	9,10E+04	6,65E-02	730 nM
	cyFolR1	1,02E+05	5,78E-02	570 nM
	muFolR1	8,32E+04	1,78E-02	210 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	5,94E+04	6,13E-02	1000 nM
	cyFolR1	6,29E+04	5,42E-02	860 nM
	muFolR1	5,68E+04	1,75E-02	300 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	2,23E+04	7,33E-04	33 nM
	cyFolR1	1,57E+04	1,60E-03	100 nM
TCB 16D5 clásico,	**huFolR1**	1,03E+04	7,59E-04	74 nM
	cyFolR1	9,18E+03	1,61E-03	175 nM
TCB 16D5 1+1 HT	**huFolR1**	2,05E+04	7,08E-04	35 nM
	cyFolR1	1,67E+04	1,53E-03	92 nM
TCB 16D5 1+1	**huFolR1**	1,43E+04	9,91E-04	69 nM

	cyFolR1	1,20E+04	1,80E-03	150 nM

La afinidad (unión monovalente) a FolR1-Fc de ser humano y de cinomolgo de TCB 36F2 es similar y de aproximadamente 1000 nM para ambos, mientras que la afinidad a FolR1-Fc murino es ligeramente mejor y de aproximadamente 300 nM. 36F2 puede usarse en modelos murinos y de primate, no hay necesidad de un subrogado.

La avidez (KD aparente) de TCB 36F2 a FolR1 humano es aproximadamente 30 veces menor que la afinidad del TCB 16D5 a FolR1 humano. En el formato bivalente, TCB 36F2 se encuentra en el bajo intervalo nanomolar, mientras que TCB 16D5 se encuentra en el bajo intervalo picomolar (diferencia de 1000 veces).

FolR1 se sobreexpresa en células tumorales, a niveles intermitentes y elevados, sobre la superficie de células cancerosas en un espectro de neoplasias epiteliales, incluyendo cánceres de ovario, mama, renal, colorrecal, pulmón y otros cánceres sólidos y también se expresa en la superficie apical de un subconjunto limitado de células epiteliales polarizadas en tejidos normales. Estas células normales no tumorales expresan FolR1 solo a bajos niveles, e incluyen, por ejemplo, células epiteliales bronquiales en la superficie alveolar, el límite luminal cortical renal de células tubulares, el epitelio pigmentario retinal (membrana basolateral) y el plexo coroide.

TCB 16D5 se une a células de tejidos normales que expresan bajas cantidades de FolR1, lo que da como resultado su eliminación mediada por células T. Esto podría, al menos en parte, ser el motivo de la tolerancia limitada observada a 10 µg/kg en monos cinomolgos. Los presentes inventores quisieron determinar si disminuyendo la afinidad de la molécula biespecífica de células T se podría aumentar la diferenciación entre tejidos con alta y baja densidad de diana y, de este modo, disminuir la toxicidad haciendo uso de la unión bivalente y la avidez. Las moléculas de unión de baja afinidad normalmente no se seleccionan como candidatos adecuados para su análisis posterior debido a que la baja afinidad se asocia a menudo con una baja potencia y eficacia. Sin embargo, se desarrolló en varios formatos la molécula de unión a FolR1 36F2 de baja afinidad y se caracterizó respecto de sus propiedades biológicas. Para el 36F2 usado en el formato biespecífico de célula T bivalente el efecto de avidez (diferencia entre unión monovalente y bivalente) es de aproximadamente 250 veces (1000 nM frente a 4 nM). A baja densidad de la diana, la afinidad definió la interacción y con 1000 nM dio lugar a una baja potencia del TCB. Sin embargo, a alta densidad de diana la avidez de la molécula entra en juego y con 4 nM dio lugar a una alta actividad del TCB (véase el ejemplo 32).

En una estrategia alternativa, los presentes inventores generaron formatos monovalentes de 16D5 y variantes de baja afinidad de 16D5 (afinidad de aproximadamente 10-40 nM) en un formato bivalente. La molécula de unión 16D5 usada en un formato monovalente (1+1) tiene una afinidad de aproximadamente 50 nM. La diferenciación entre tejidos de alta y baja densidad de diana puede lograrse mejor beneficiándose del efecto de avidez.

Ejemplo 32

Eliminación mediada por células T de células SKOV-3 inducida por TBC 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5

Se evaluó la eliminación por células T mediada por anticuerpos TCB 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5 se evaluó en células SKov-3 (FolR1 medio). Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h y 48 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,005 pM - 5 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h y 48 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que la eliminación inducida por 36F2 está fuertemente reducida en comparación con TCB Mov19 y TCB 21A5 (figuras 23A-B). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación, calculados usando GraphPadPrism6 se resumen en la tabla 27.

Tabla 27: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células SKov-3 que expresan FolR1 inducida por TCB 36F2, TCB Mov19 y TCB 21A5.

	CE50 [pM]	
Anticuerpo	**24 h**	**48 h**
TCB 36F2	1406,07*	134,5
TCB Mov19	0,75	0,05
TCB 21A5	2,83	0,10

** la curva no alcanzó la saturación, el valor es hipotético*

Ejemplo 33

Eliminación por células T inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5 en diferentes formatos biespecíficos de célula T monovalentes y bivalentes

Se evaluó la eliminación por células T mediada por anticuerpos TCB 36F2, TCB 16D5, TCB 16D5 clásico, TCB 16D5 1+1 y TCB 16D5 HT de células tumorales Hela (FolR1 alto, aproximadamente 2 millones de copias, Tabla 14, Fig. 27), Skov-3 (FolR1 medio, aproximadamente 70000-90000 copias, Tabla 14, Fig. 27) y HT-29 (FolR1 bajo, aproximadamente 10000, Tabla 14, Fig. 27) humanas. Se incluyó el anticuerpo TCB DP47 como control negativo. Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h de incubación con el anticuerpo biespecífico. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS

estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 100 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que la eliminación específica de diana de las tres líneas celulares diana FolR1+ por TCB 36F2 es mucho más débil en comparación con la eliminación inducida por TCB 16D5 (Las **figuras** 24A-C, tabla 29). La eliminación específica de diana inducida por los TCB 16D5 monovalentes (HT 16D5 y 16D5 1+1) es peor en comparación con los TCB 16D5 bivalentes (TCB 16D5 y TCB 16D5 clásico). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación, calculados usando GraphPadPrism6, se resumen en la tabla 28. De manera importante, estos datos muestran que usando la molécula de unión a FolR1 36F2 en el formato de TCB bivalente 2+1 se amplía la ventana terapéutica en comparación con el TCB de FolR1 16D5 (Fig. 24A-C). Mientras que la reducción de la potencia entre el TCB de FolR1 16D5 y 36F2 es de aproximadamente 45 veces para células HeLa (expresión elevada de FolR1, véase la tabla 28: TCB 16D5 = 0,8 frente a TCB 36F2 36,0) y de aproximadamente 297 veces para células Skov3 (expresión media de FolR1, véase la tabla 28: TCB 16D5 = 0,6 frente a TCB 36F2 178,4), esta reducción es de prácticamente 7000 veces para HT29 con baja expresión de FolR1 (véase la tabla 28: TCB 16D5 = 5,7 frente a TCB 36F2 39573). Por lo tanto, El TCB de FolR1 36F2 diferencia entre células de alta y baja expresión, lo que es de especial importancia para reducir la toxicidad, y que las células de algunos tejidos normales, no tumorales expresan niveles muy bajos de FolR1 (aproximadamente menos de 1000 copias por célula). De manera coherente con esta observación, los resultados discutidos en el ejemplo 35 más adelante demuestran que el TCB 36F2 no induce la eliminación por células T de células primarias (figuras 26A-D) mientras que puede observarse cierto grado de eliminación para TCB 16D5 en células HRCEpiC y HRPEpiC tras 48 h de incubación (figuras 26B y C). Esta característica importante de TCB 36F2 permite la dosificación para el tratamiento de tumores

positivos a FolR1 de tal forma que media una potente eliminación de tejidos tumorales con expresión alta o media de FolR1, pero no de tejidos normales con baja expresión (parcialmente polarizada). De manera notable, esta característica parece estar mediada por la avidez de TCB 36F2 en el formato bivalente invertido 2+1, que no se observó cuando se usaron los formatos monovalentes 1+1 que portaban la misma molécula de unión de baja afinidad 36F2.

Dicho de otro modo, TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 comprende restos de unión a FolR1 de relativamente baja afinidad pero posee un efecto de avidez que permite diferenciar entre células con alta y baja expresión de FolR1. Debido a que las células tumorales expresan FolR1 a niveles elevados o intermedios, este TCB se une de manera selectiva a células tumorales y no a células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto.

Además de las características ventajosas anteriores, el TCB 36F2 en el formato invertido bivalente 2+1 tiene también la ventaja de que no necesita reticulación química u otra estrategia híbrida. Esto lo hace adecuado para la fabricación de un medicamento para tratar a pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen tumores cancerosos positivos a FolR1. El TCB 36F2 en el formato invertido bivalente 2+1 puede producirse usando procesos de CHO convencionales con bajos agregados. Además, el TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 comprende secuencias humanas y humanizadas, haciéndolo superior a las moléculas que emplean polipéptidos de rata y murinos que son altamente inmunogénicos cuando se administran a seres humanos. Además, el TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 se diseñó por ingeniería genética para suprimir la unión a FcgR y, como tal, no causa reticulación con FcgR y reacciones a la infusión, potenciando además su seguridad cuando se administra a pacientes.

Tal como se ha demostrado por los resultados descritos anteriormente, su geometría de cabeza a cola hace que el TCB 36F2 en el formato invertido bivalente 2+1 sea una molécula altamente potente que induce la eliminación absoluta de la célula diana. Su bivalencia magnifica la avidez y la potencia, pero también permite diferenciar entre células con alta y baja expresión. Su preferencia por células de expresión alta o media de diana debido a su efecto de avidez reduce la toxicidad resultante de la eliminación mediada por células T de células normales que expresan FolR1 a niveles bajos.

Una ventaja adicional del TCB 36F2 en el formato bivalente 2+1 y otras realizaciones divulgadas en el presente documento es que su desarrollo clínico no necesita del uso de moléculas subrogadas ya que se unen a FolR1 humano, de cinomolgo y murino. Como tales, las moléculas divulgadas en el presente documento reconocen un epítopo distinto al de los anticuerpos para FolR1 descritos anteriormente que no reconocían a FolR1 de todas las especies.

Tabla 28: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células tumorales que expresan FolR1 inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5 en diferentes formatos monovalentes y bivalentes biespecíficos de células T tras 24 h de incubación.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,8	0,6	5,7
TCB 16D5 clásico,	4,6	2,0	13,0
TCB 16D5 HT	11,6	12,3	15,1
TCB 16D5 1+1	23,8	48,9	883,8*
TCB 36F2	36,0	178,4	*39573,0**

** la curva no alcanzó la saturación, solo valor hipotético*

La tabla 29 muestra una comparación de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2 en las diferentes líneas celulares ensayadas. De los valores de CE50 obtenidos se calculó el incremento (CE50 de TCB 16D5 menos CE50 de TCB 36F2) y la diferencia en x veces (CE50 de TCB 16D5 dividida entre la CE50 de TCB 36F2).

Tabla 29: Comparación de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,82	0,63	5,73
TCB 36F2	35,99	178,40	39573,00*
Δ	35,17	177,77	39567,27
x veces	43,83	284,61	6906,58

** la curva no alcanzó la saturación, solo valor hipotético*

Los valores de CE50 calculados muestran claramente que la diferencia entre TCB 36F2 y TCB 16D5 se hace mayor cuanto menor sea la expresión de FolR1 en las células diana.

Los mismos cálculos efectuados para la comparación de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2 se efectuaron para TCB 16D5 y los dos TCB 16D5 monovalentes (TCB 16D5 HT y 16D5 1+1). Las tablas 30 y 31 muestran las comparaciones de los valores de CE50 de TCB 16D5 frente a TCB 16D5 HT (tabla

30) y TCB 16D5 frente a TCB 16D5 1+1 (tabla 31) así como los incrementos correspondientes (CE50 de TCB 16D5 menos CE50 de TCB 16D5 HT/1+1) y las diferencias de x veces (CE50 de TCB 16D5 dividida entre la CE50 de TCB 16D5 HT/1+1).

Tabla 30: Comparación de valores de CE50 de TCB 16D5 (2+1 invertido) y TCB 16D5 HT.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,82	0,63	5,73
TCB 16D5 HT	11,61	12,27	15,11
Δ	10,79	11,65	9,38
x veces	14,14	19,58	2,64

Tabla 31: Comparación de valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 16D5 1+1.

Anticuerpo	**Hela (FolR1 alto)**	**Skov-3 (FolR1 medio)**	**HT-29 (FolR1 bajo)**
TCB 16D5	0,82	0,63	5,73
TCB 16D5 1+1	23,84	48,86	883,78*
Δ	23,02	48,24	878,05
x veces	29,03	77,95	154,24

** la curva no alcanzó la saturación, solo valor hipotético*

Las comparaciones de los valores de CE50 de TCB 16D5 y TCB 36F2 (tabla 29) muestra que la diferencia en los valores de CE50 se hace mayor cuanto menor sea la expresión de FolR1 en las células diana. Este efecto no puede observarse en la comparación de TCB 16D5 y los TCB 16D5 monovalentes (tabla 29 y tabla 30). Para TCB 16D5 1+1 (tabla 31) también hay un ligero aumento en la diferencia entre la CE50 de TCB 16D5 y TCB 16D5 1+1 con la disminución de la expresión de FolR1 pero ni de lejos tan pronunciada como la que puede observarse en la comparación de TCB 16D5 frente a TCB 36F2.

Ejemplo 34

Regulación positiva de CD25 y CD69 en células efectoras CD8+ y CD4+ tras la eliminación por células T de células tumorales que expresan FolR1 inducida por TCB 36F2 y el anticuerpo TCB 16D5

La activación de células T $CD8^+$ y $CD4^+$ después de la eliminación por células T de células tumorales Hela, SKov-3 y HT-29 que expresaban FolR1 mediada por TCB

36F2 y TCB 16D5 se evaluó mediante análisis FACS usando anticuerpos que reconocían los marcadores de activación de células T CD25 (marcador de activación tardío) y CD69 (marcador de activación temprana). Se incluyó TCB DP47 como control sin unión. El anticuerpo y las condiciones del ensayo de eliminación fueron esencialmente como se describieron anteriormente (ejemplo 32) usando el mismo intervalo de concentración del anticuerpo (0,01 pM – 100 nM en triplicados), relación E:T 10:1 y un tiempo de incubación de 48h.

Después de la incubación, se transfirieron los PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugaron a 400 x g durante 4 min y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1 %. La tinción superficial para CD8 (PE anti-CD8 humano, BD n.º 555635), CD4 (Brilliant Violet 421™ anti-CD4 humano, Biolegend n.º 300532), CD69 (FITC anti-CD69 humano, BD n.º 555530) y CD25 (APC anti-CD25 humano, BD n.º 555434) se efectuó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 %. Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS al 0,1 % para la medida de FACS. Las muestras se analizaron en un dispositivo BD FACS Canto II.

TCB 36F2 indujo una regulación positiva específica de la diana de los marcadores de activación (CD25, CD69) en células T CD8+ y CD4+ tras la eliminación de células Hela (figura 25A) y SKov-3 (figura 25B). En comparación con TCB 16D5 la regulación positiva de CD25 y CD69 en células T CD8+ y CD4+ inducida por 36F2 es mucho más débil.

En HT-29 (FolR1 bajo) solo puede observarse una regulación positiva de los marcadores de activación a la concentración más alta de TCB 36F2. Por el contrario, con TCB 16D5 la regulación positiva de CD25 y CD69 ya puede observarse a concentraciones de anticuerpo mucho más bajas (figura 25C).

Tal como también se observa en el experimento de lisis tumoral, el análisis de los marcadores de activación (CD25 y CD69) en células T (CD4+ y CD8+) después de la eliminación muestra claramente que la diferencia entre TCB 16D5 y TCB 36F2 se hace mayor cuanto menor es el nivel de expresión de FolR1 en la célula diana.

Ejemplo 35

Eliminación por células T de células primarias inducida por TCB 36F2 y TCB 16D5

La eliminación por células T mediada por TCB 36F2 y TCB 16D5 se evaluó en células primarias (células epiteliales corticales renales humanas (HRCEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 4110) y células epiteliales pigmentarias retinales humanas (HRPEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 6540)). Se incluyeron células HT-29 (FolR1 bajo) como línea celular de control. TCB DP47

sirvió de control sin unión. Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h y 48 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 10 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h y 48 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que TCB 36F2 no induce eliminación por células T de células primarias (figura 26A - D) mientras que puede observarse cierto grado de eliminación para TCB 16D5 en células HRCEpiC y HRPEpiC tras 48 h de incubación (figura 26B y D). Tal como se ha descrito anteriormente, se observó una fuerte diferencia en la eliminación por células T de células HT-29 entre TCB 16D5 y TCB 36F2 (Fig. 26E, F).

Ejemplo 36

Preparación de TCB DP47 GS

(2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertido = “TCB no dirigido”)

El “TCB no dirigido” se usó como control en los experimentos anteriores. El

anticuerpo biespecífico se acopla a CD3e pero no se une a cualquier otro antígeno y por lo tanto no puede reticular a células T con ninguna célula diana (y por consiguiente no puede inducir eliminación). Por lo tanto se usó como control negativo en los ensayos para controlar cualquier activación inespecífica de células T. Este TCB no dirigido se preparó tal como se describe en el documento WO2014/131712. En resumen, se subclonaron las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera en fase con la cadena pesada constante o la cadena ligera constante preinsertadas en el vector de expresión en mamífero receptor respectivo. La expresión del anticuerpo estaba dirigida por un promotor de MPSV y porta una secuencia de señal de poli A sintética en el extremo 3' del CDS. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de VEB.

La molécula se produjo transfectando conjuntamente a células HEK293-EBNA con los vectores de expresión en mamífero usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión a una relación 1:2:1:1 ("vector de Fc(agujero) de cadena pesada": "vector de cadena ligera": "vector de crossfab de cadena ligera": “vector vector de Fc(pomo) de cadena pesada-FabCrossfab”).

Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agitó vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz agitado de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadieron ácido valproico 1 mM y alimentación 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recogió el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añadió azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

La proteína secretada se purificó a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. Se cargó el sobrenadante en una columna HiTrap ProteinA HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml

de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína diana se eluyó usando un gradiente en 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5 a citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 2,5. La solución de proteína se neutralizó añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8. La proteína diana se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, solución de cloruro de sodio 140 mM pH 6,0.

La concentración proteica de las muestras de proteína purificada se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos.

La pureza y peso molecular de las moléculas se analizaron mediante análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Lifescience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µg de muestra para los análisis.

El contenido agregado de las muestras de anticuerpo se analizó usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C.

Tabla 32: Resumen de la producción y purificación de TCB DP47 GS

Construcción	Título [mg/l]	Rendimiento [mg/l]	Agregado después de la 1ª etapa de purificación [%]	APM [%]	BPM [%]	Monómero [%]
TCB DP47 GS	103,7	8,04	8	2,3	6,9	91,8

Tabla 33: Análisis de CE-SDS de TCB DP47 GS

	Pico	kDa	Cadena correspondiente
TCB DP47 GS no reducido (A)	1	165,22	Molécula con 2 cadenas ligeras ausentes
	2	181,35	Molécula con 1 cadena ligeras ausente
	3	190,58	Molécula correcta con glucosilación unida en N
	4	198,98	Molécula correcta
TCB DP47 GS reducido (B)	1	27,86	Cadena ligera DP47 GS
	2	35,74	Cadena ligera huCH2527
	3	63,57	Fc(agujero)
	4	93,02	Fc(pomo)

Ejemplo 37

Unión de TCB 16D5 y sus correspondientes variantes de desamidación de CD3 N100A y S100aA a células Jurkat que expresan CD3

Se evaluó la unión de TCB 16D5 y de las variantes de desamidación de CD3 correspondientes TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA a CD3 en una línea de linfocitos T inmortalizada que expresa CD3 (Jurkat). En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (686 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure conjugado a PE (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-116-170). después de lavar las muestras dos veces con PBS frío con BSA al 0,1 % se analizaron inmediatamente mediante FACS usando un FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 28A-B).

Los resultados muestran unión reducida de las variantes de desamidación N100A y

S100aA a CD3 en comparación con los anticuerpos progenitores TCB 16D5 (Fig. 28A)

Ejemplo 38

Eliminación por células T de células SKov-3 y HT-29 inducida por TCB 16D5 y sus variantes de desamidación de CD3 N100A y S100aA

Se evaluó la eliminación por células T mediada por TCB 16D5 y las correspondientes variantes de desamidación de CD3 TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA en células SKov-3 (FolR1 medio) y HT-29 (FolR1 bajo). Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 10 nM en triplicados). Los PBMC se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados muestran que en células SKov-3 la eliminación inducida por las variantes de desamidación de CD3 TCB 16D5 N100A y TCB 16D5 S100aA es comparable a la inducida por TCB 16D5 (Fig. 29A). En células HT-29 que expresan

FolR1 bajo la variante S100aA muestra una eficacia de la eliminación deteriorada que es el caso para TCB 16D5 (Fig. 30A). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación, calculados usando GraphPadPrism6 se proporcionan en la tabla 35.

Tabla 35: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células SKov-3 y HT-29 que expresan FolR1 inducida por TCB 16D5 y sus variantes de desamidación N100A y A100aA.

	CE50 [pM]	
Anticuerpo	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 16D5	1,283	56,67
TCB 16D5 N100A	1,886	91,95
TCB 16D5 S100aA	1,939	165,6

** No determinado*

Ejemplo 39

Caracterización bioquímica mediante resonancia de plasmón superficial de TCB de dos variantes de molécula de unión a CD3 (N100A y S100A) para eliminar un sitio de desamidación

Se evaluó la unión de dos TCB 16D5 con variantes de unión a CD3 (N100A o S100aA) a CD3 humano recombinante (heterodímero de CD3epsilon-CD3delta como fusión de Fc) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

Afinidad a CD3ed-Fc

La afinidad de la interacción entre las moléculas biespecíficas de células T anti-FolR1 y el heterodímero CD3 epsilon-delta recombinante se determinó tal como se describe a continuación (tabla 36).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 6000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de

amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 a 200 nM con un caudal de 20 µl/min durante 60 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (4,1 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano y de cinomolgo a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 240 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 36: Unión monovalente (afinidad) de dos variantes de desamidación de CD3 de 16D5 como TCB en CD3ed-Fc humano.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
TCB 16D5 N100A	**huCD3**	1,23E+04	4,67E-03	380 nM
TCB 16D5 S100aA	**huCD3**	1,21E+04	5,49E-03	460 nM
TCB 16D5	**huCD3**	2,03E+04	4,41E-03	220 nM

Las dos variantes de desamidación de CD3 tienen una afinidad ligeramente reducida en comparación con la molécula de unión de CD3 de tipo silvestre (CH2527), pero la diferencia no es grande.

Ejemplo 40

Producción y purificación de dos variantes de 16D5 biespecífico de células T con mutaciones para eliminar el sitio de desamidación en la molécula de unión a CD3: TCB 16D5 N100A, TCB 16D5 S100aA

Transfección y producción transitoria

Las dos variantes de desamidación de los TCB 16D5 se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C. Después de la producción se recogió el sobrenadante, se filtró a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación

Las dos variantes de desamidación de TCB 16D5 se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna MabSelect SuRe (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 2 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, citrato de sodio 20 mM). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 20 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron hasta 1 ml usando

ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Se agruparon las fracciones que contenían menos del 2 % de oligómeros. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 36: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de las dos variantes de desamidación de 16D5 en el formato biespecífico de célula T.

Nombre	Mutación en la molécula de unión a CD3	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
TCB 16D5	N100A	9	100	89
TCB 16D5	S100aA	23	100	83
TCB 16D5	Tipo silvestre	9	100	93

Ambos TCB se produjeron con buena calidad, similar a la construcción con la molécula de unión a CD3 de tipo silvestre.

Ejemplo 41

Producción y purificación de dos variantes de moléculas de unión de 16D5 (D52dE y D52dQ) como IgG para eliminar un punto caliente en la CDR

Transfección y producción transitoria

Las dos IgG se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron

de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantiene a 4 °C. Después de la producción se recogen los sobrenadantes y los sobrenadantes que contienen anticuerpo se filtraron a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación de anticuerpos

Las dos IgG se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna POROS MabCapture A (Applied Biosystems, volumen de columna (vc) = 1 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 5 vc. Los 5 ml que contenían la proteína de interés se almacenaron en un bucle en el Äkta Explorer y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad 16/60 Superdex^{TM} 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM (no se usó Tween). Las fracciones que contenían las IgG se agruparon y concentraron usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore). El contenido agregado del grupo final se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un

agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se almacenaron a 4 °C.

Tabla 37: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de dos variantes de punto caliente de IgG de 16D5.

Clon	Mutación HC/LC	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
16D5	D52dE	24	100	96
16D5	D52dQ	20	100	96

Ambas IgG se produjeron bien y con buena calidad.

Ejemplo 42

Caracterización bioquímica mediante resonancia de plasmón superficial de dos variantes de moléculas de unión de 16D5 (D52dE y D52dQ) como IgG para eliminar un punto caliente en la CDR

Se evaluó la unión de dos variantes de molécula de unión de 16D5 (D52dE y D52dQ) como IgG para receptor 1 de folato recombinante humano y de cinomolgo (ambos como fusiones a Fc) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

1. Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 38).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 160 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 3,7 a 900 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 600 segundos. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2 murino-Fc biotinilada recombinante. Las curvas de unión resultantes de la unión

bivalente de las IgG o de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 38: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de dos variantes de punto caliente de 16D5 como IgG en FolR1 humano, murino y de cinomolgo (sin unión a muFolR1, tal como se esperaba).

Analito	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
IgG 16D5 D52dE	**huFolR1**	1,62E+05	5,45E-04	3,4 nM
	cyFolR1	2,98E+06	7,47E-03	2,5 nM
IgG 16D5 D52dQ	**huFolR1**	8,40E+04	7,75E-04	9,2 nM
	cyFolR1	4,12E+05	2,04E-03	5 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	2,25E+05	5,00E-04	2,2 nM
	cyFolR1	2,71E+05	6,3E-04	2,5 nM

2. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 39).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 10000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,35 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano y de cinomolgo a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto

restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 39: Unión monovalente (afinidad) de dos variantes de punto caliente de 16D5 como IgG en FolR1 humano y de cinomolgo.

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
IgG 16D5 D52dE	**huFolR1**	2,40E+04	2,27E-03	95 nM
	cyFolR1	2,25E+04	1,20E-02	530 nM
IgG 16D5 D52dQ	**huFolR1**	6,97E+03	1,62E-03	230 nM
	cyFolR1	8,20E+03	3,32E-03	410 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	2,05E+04	7,05E-04	35 nM
	cyFolR1	1,72E+04	1,62E-03	90 nM

Las dos variantes de punto caliente de 16D5 tienen una avidez similar (unión bivalente) a la de la molécula de unión 16D5 de tipo silvestre. La avidez disminuye ligeramente para la variante D52dQ y esta diferencia es aún más visible en la afinidad (unión monovalente).

Ejemplo 43

Producción y purificación de doce variantes de la molécula de unión 16D5 como IgG con mutaciones en la cadena ligera y pesada para reducir la afinidad a FolR1

Transfección y producción transitoria

Las doce IgG se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Las células HEK293 EBNA se cultivan en suspensión sin suero en medio de cultivo CD CHO. Para la producción en matraz agitado de 500 ml se siembran 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección (para escalas alternativas todas las cantidades se ajustaron de acuerdo con esta). Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución de PEI se agita

vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfieren a un matraz agitado de 500 ml y se incuban durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 160 ml de medio F17 y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantiene a 4 °C. Después de la producción se recogen los sobrenadantes y los sobrenadantes que contienen anticuerpo se filtraron a través de filtros estériles de 0,22 µm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación de anticuerpos

Todas las moléculas se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna POROS MabCapture A (Applied Biosystems, volumen de columna (vc) = 1 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 7.5). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 5 vc. Los 5 ml que contenían la proteína de interés se almacenaron en un bucle en el Äkta Explorer y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad 16/60 Superdex^{TM} 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. Las fracciones que contenían las IgG se agruparon y concentraron usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore). El contenido agregado del grupo final se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7, tampón de ejecución a 25 °C. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se almacenaron a 4 °C.

Tabla 40: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de doce variantes de IgG de 16D5.

Clon	Mutación HC/LC	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
16D5	W98Y/wt	32	100	100
16D5	W98Y/K53A	24	100	100
16D5	S35H/wt	21	100	100
16D5	S35H/K53A	18	100	100
16D5	S35H/S93A	18	100	100
16D5	W96Y/wt	40	100	100
16D5	W96Y/K53A	21	100	100
16D5	W96Y/S93A	25	98	100
16D5	R50S/K53A	10	98	100
16D5	R50S/S93A	7	100	100
16D5	G49S/K53A	42	100	100
16D5	G49S/S93A	45	100	100

Todas las doce IgG se produjeron bien y con buena calidad.

Ejemplo 44

Caracterización bioquímica de las variantes de combinación de cadena pesada y ligera de 16D5 como IgG mediante resonancia de plasmón superficial

La unión de las moléculas de unión variantes de combinación de cadena pesada y ligera de 16D5 de FolR1 como IgG para diferentes receptores de folato recombinantes (FolR1 de ser humano, murino y de cinomolgo; todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo/Alemania).

Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 41).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una

microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300 UR. Las IgG anti-FolR1 o biespecíficas de célula T se pasaron a un intervalo de concentración de 11,1 a 900 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 240 o 600 segundos. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de receptor de IL-2 murino-Fc biotinilada recombinante. Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las IgG o de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). Para las cinéticas de afinidad con fases de asociación y disociación demasiado rápidas como para ajustarlas a un modelo de unión de Langmuir 1:1, se aplicó el modelo de análisis de estado estacionario usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). El análisis de estado estacionario proporciona la KD de la reacción de unión en el equilibrio.

Tabla 41: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de doce moléculas de unión variantes de 16D5 como IgG en FolR1 de ser humano, murino y de cinomolgo.

Analito Variante de HC/variante de LC	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
W98Y/K53A	**huFolR1**			Unión débil
	cyFolR1			Unión débil
S35H/K53A	**huFolR1**	2,10E+04	2,91E-02	1400 nM
	cyFolR1	3,47E+04	4,04E-02	1100 nM
W96Y/K53A	**huFolR1**			580 nM (estado estacionario)
	cyFolR1			660 nM (estado estacionario)
W98Y/wt	**huFolR1**	1,36E+05	3,28E-02	240 nM

Analito Variante de HC/variante de LC	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD aparente
	cyFolR1	1,71E+05	3,61E-02	200 nM
S35H/S93A	**huFolR1**	2,43E+05	2,20E-02	90 nM
	cyFolR1	6,12E+05	6,77E-02	110 nM
G49S/K53A	**huFolR1**	1,90E+05	1,15E-02	60 nM
	cyFolR1	3,93E+05	3,28E-02	80 nM
R50S/K53A	**huFolR1**	3,28E+05	1,97E-02	60 nM
	cyFolR1	5,50E+05	4,55E-02	80 nM
S35H/wt	**huFolR1**	1,32E+05	5,68E-03	40 nM
	cyFolR1	2,23E+05	1,24E-02	55 nM
R50S/S93A	**huFolR1**	1,25E+05	3,23E-03	30 nM
	cyFolR1	4,39E+05	7,80E-03	20 nM
W96Y/S93A	**huFolR1**	6,55E+05	1,89E-02	30 nM
	cyFolR1	6,25E+05	1,74E-02	30 nM
G49S/S93A	**huFolR1**	1,52E+05	3,06E-03	20 nM
	cyFolR1	3,58E+05	6,22E-03	20 nM
W96Y/wt	**huFolR1**	1,29E+05	2,13E-03	20 nM
	cyFolR1	1,73E+05	2,11E-03	10 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	2,44E+06	1,37E-02	6 nM
	cyFolR1	4,12E+06	2,15E-02	5 nM
	muFolR1	4,86E+05	1,20E-03	2,5 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	1,41E+05	4,25E-04	3 nM
	cyFolR1	1,78E+05	6,39E-04	3,5 nM

Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las IgG anti-FolR1 o las moléculas biespecíficas de célula T y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 42).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 10000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron IgG anti-FolR1 o moléculas biespecíficas de célula T a 200 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,35 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 42: Unión monovalente (afinidad) de doce moléculas de unión a FolR1 variantes de 16D5 sobre FolR1 de ser humano, de cinomolgo y murino.

Ligando Variante de HC/variante de LC	**Analito**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD**
W98Y/K53A	**huFolR1**			Sin unión
S35H/K53A	**huFolR1**			Unión débil
W96Y/K53A	**huFolR1**			Unión débil
W98Y/wt	**huFolR1**			5400 nM (estado estacionario)
G49S/K53A	**huFolR1**	9,19E+03	1,74E-02	1900 nM
R50S/K53A	**huFolR1**	1,35E+04	2,45E-02	1800 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	5,00E+04	8,57E-02	1700 nM
S35H/S93A	**huFolR1**	8,43E+03	1,12E-02	1300 nM

Ligando Variante de HC/variante de LC	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
S35H/wt	**huFolR1**	8,96E+03	1,13E-02	1200 nM
R50S/S93A	**huFolR1**	1,57E+04	1,23E-02	780 nM
G49S/S93A	**huFolR1**	1,05E+04	7,99E-03	760 nM
W96Y/wt	**huFolR1**	9,95E+03	5,44E-03	550 nM
W96Y/S93A	**huFolR1**	4,05E+04	1,72E-02	420 nM
TCB 16D5	**huFolR1**	1,18E+04	7,22E-04	60 nM

Se analizaron doce variantes de afinidad reducida de la molécula de unión a FolR1 16D5 mediante resonancia de plasmón superficial en comparación con la molécula de unión de tipo silvestre 16D5 y la molécula de unión 36F2. El objetivo era encontrar una variante de 16D5 con una afinidad y una avidez comparables a 36F2. Cuando se midió la unión monovalente (afinidad) hubo doce variantes con una afinidad mayor y variantes con una afinidad menor que 36F2. Sin embargo, en la unión bivalente (avidez) todas las variantes tienen un valor de KD aparente mayor que 36F2. Esto se debe principalmente a la rápida velocidad de asociación (ka) de 36F2 que da como resultado una KD aparente pequeña para 36F2. El gran efecto de avidez cuando 36F2 se une de manera bivalente parece ser único para esta molécula de unión. Como se ha indicado anteriormente, 36F2 fue la única molécula de unión con reactividad cruzada con ser humano, murino y cinomolgo que pudo identificarse.

Ejemplo 45

Unión de variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HeLa

La unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y diversas variantes HC/LC de 16D5 a FolR1 humano se evaluó en células Hela. En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (229 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG

humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure conjugado a PE (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-116-170). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío y BSA al 0,1 % se fijaron con PFA al 1 % durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 32A-E). El TCB 36F2 se unió a FolR2, no fue bien tolerado por los ratones, y no mostró la eficacia deseada.

Ejemplo 46

Producción y purificación de cuatro variantes de la molécula biespecífica de células T 16D5 con mutaciones para reducir la afinidad a FolR1 de ser humano y de cinomolgo:

TCB 16D5 G49S/S93A, G49S/K53A, W96Y, W96Y/D52E

Transfección y producción transitoria

Se produjeron de manera transitoria cuatro variantes adicionales de TCB 16D5 que tenían afinidad reducida a FolR1 en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Para la transfección, se cultivan las células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo Excell que contiene L-glutamina 6 mM y 250 mg/l de medio de cultivo G418. Para la producción en matraces Tubespin de 600 (volumen máximo de trabajo 400 ml) se sembraron 600 millones de células HEK293 EBNA 24 antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 400 µg de ADN. Después de la adición de 1080 µl de solución de PEI (2,7 µg/ml) se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz Tubespin de 600 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 360 ml de Excell + L-glutamina 6mM + 5g/l Pepsoy + medio VPA 1,0 mM y las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade Feed 7 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 20 - 30 min a 3600 x g (centrifugadora Sigma 8K), la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

Purificación

Las variantes de afinidad reducida de TCB 16D5 se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de

proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna HiTrap proteína A (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 5 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, citrato de sodio 20 mM). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 20 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron hasta 1 ml usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Se agruparon las fracciones que contenían menos del 2 % de oligómeros. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 43: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de las variantes de 16D5 de afinidad reducida en el formato biespecífico de célula T.

Nombre	Mutaciones para reducir la afinidad	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
TCB 16D5	G49S S93A	10,3	100	88
TCB 16D5	G49S K53A	22,3	98,5	96
TCB 16D5	W96Y	15,2	98,7	92,5
TCB 16D5	W96Y D52E	9,9	99,3	92,9
TCB 16D5	Tipo silvestre	5,4	96	91,6

Todas las variantes con afinidad reducida pudieron producirse con buena calidad.

Ejemplo 47

Unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y las dos variantes de afinidad reducida de 16D5, TCB 16D5 W96Y/D52E y TCB 16D5 G49S/S93A a FolR1 expresado en células HeLa

La unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y las dos variantes de afinidad reducida de 16D5, TCB 16D5 W96Y/D52E y TCB 16D5 G49S/S93A a FolR1 se evaluó en células HeLa. En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (30 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure conjugado a FITC (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-096-098). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío con BSA al 0,1% se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 33).

Ejemplo 48

Producción y purificación de tres moléculas biespecíficas de célula T con afinidad intermedia a Folr1 de ser humano y de cinomolgo: 14B1, 6E10, 2C7

Transfección y producción transitoria

Los TCB de afinidad intermedia se produjeron de manera transitoria en células HEK293 EBNA usando un procedimiento de transfección mediado por PEI para los vectores necesarios tal como se describe a continuación. Para la transfección, se cultivan las células HEK293 EBNA en suspensión sin suero en medio de cultivo Excell que contiene L-glutamina 6 mM y 250 mg/l de medio de cultivo G418. Para la producción en matraces Tubespin de 600 (volumen máximo de trabajo 400 ml) se sembraron 600 millones de células HEK293 EBNA 24 antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugan durante 5 min a 210 x g, se reemplaza el sobrenadante por 20 ml de medio CD CHO. Los vectores de expresión se mezclan en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 400 µg de ADN. Después de la adición de 1080 µl de solución de PEI (2,7 µg/ml) se agita vorticialmente durante 15 s y posteriormente se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclan las células con solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz Tubespin de 600 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después del tiempo de incubación se añaden 360 ml de Excell + L-glutamina 6mM + 5g/l Pepsoy + medio VPA 1,0 mM y

las células se cultivan durante 24 horas. Un día después de la transfección se añade Feed 7 al 7 %. Después de 7 días de cultivo se recoge el sobrenadante para su purificación mediante centrifugación durante 20 - 30 min a 3600 x g (centrifugadora Sigma 8K), la solución se esteriliza por filtración (filtro de 0,22 µm) y se añade azida de sodio a una concentración final del 0,01 % p/v, y se mantuvo a 4 °C.

Purificación

Los TCB de afinidad intermedia se purificaron en dos etapas usando procedimientos convencionales, tales como purificación por afinidad de proteína A (Äkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño. El sobrenadante obtenido de la producción transitoria se ajustó a pH 8,0 (usando TRIS 2 M pH 8,0) y se aplicó a una columna HiTrap proteína A (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 5 ml) equilibrada con 8 volúmenes de columna (vc) de tampón A (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, citrato de sodio 20 mM). Después de lavar con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó usando un gradiente de pH al tampón B (citrato de sodio 20 mM, pH 3,0, NaCl 100 mM, glicina 100 mM) en 20 vc. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon y se ajustó levemente el pH de la solución a pH 6,0 (usando Na_2HPO_4 0,5 M, pH 8,0). Las muestras se concentraron hasta 1 ml usando ultraconcentradores (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) y posteriormente se aplicaron a una columna HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de grado preparativo (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01 %. El contenido agregado de fracciones eluidas se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Por lo tanto, se aplicaron 30 µl de cada fracción a una columna de exclusión por tamaño analítica TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) equilibrada en K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125 mM, monoclorhidrato de L-arginina 200 mM, NaN_3 al 0,02 % (p/v), pH 6,7 tampón de ejecución a 25 °C. Se agruparon las fracciones que contenían menos del 2 % de oligómeros. La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de las construcciones se analizaron mediante electroforesis de capilaridad en SDS (CE-SDS) en presencia y ausencia de un agente reductor siguiendo las instrucciones del fabricante (instrumento: Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Las proteínas purificadas se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 44: Rendimiento, contenido de monómero y pureza mediante CE-SDS de los TCB de afinidad intermedia.

Nombre	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	Pureza mediante CE-SDS [%]
TCB 6E10	2,3	93	95
TCB 14B1	1,8	94	70
TCB 9C7	3,4	98	99

Se pudieron producir todas las moléculas biespecíficas de célula T de afinidad intermedia. Los rendimientos no son altos. La calidad es buena para 9C7 y aceptable para 14B1 y 6E10.

Ejemplo 49

Unión de variantes HC/LC 16D5 a FolR1 humano expresado en células HT-29

La unión de TCB 36F2, TCB 16D5 y diversas variantes HC/LC (Figura 34A-E) de 16D5 a FolR1 humano se evaluó en células HT-29. En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones diferentes los anticuerpos biespecíficos (229 pM - 500 nM). Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcg de cabra anti-IgG humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure conjugado a PE (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-116-170). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío y BSA al 0,1 % se fijaron con PFA al 1 % durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Figuras 34A-E).

Ejemplo 50

Unión de moléculas de unión a FolR1 intermedias a FolR1 y FolR2 de ser humano y de ratón

La reactividad cruzada de las moléculas de unión a FolR1 intermedias (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), así como de TCB 16D5 y TCB 36F2 a FolR1 y FolR2 de ser

humano y de cinomolgo se evaluó en un ensayo de unión FACS en células HEK293T transfectadas.

En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10^6 células/ml en tampón de FACS (100 µl de PBS, BISA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10^6 células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con 100 nM de los anticuerpos biespecíficos. Después de dos etapas de lavado con PBS frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min adicionales a 4 °C con un anticuerpo secundario específico de fragmento Fcγ de cabra anti-IgG humana de fragmento $F(ab')_2$ AffiniPure de fluoresceína (FITC) (Jackson Immuno Research Lab PE, n.º 109-096-098). Después de lavar las muestras dos veces con PBS frío y BSA al 0,1 % se fijaron con PFA al 1 % durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras, se resuspendieron en PBS PBS con BSA al 0,1 % y se analizaron mediante FACS usando un dispositivo FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las gráficas se obtuvieron usando GraphPadPrism6 (Fig. 33).

Los resultados muestran que TCB 36F2 y TCB 14B1 tienen reactividad cruzada con FolR1 de ratón y con FolR2 humano y de ratón. Puede observarse una unión débil a FolR2 para TCB 6E10 TCB. TCB 16D5 y TCB 9C7 son específicos para FolR1 humano y no muestran reactividad cruzada con FolR1 de ratón o FolR2 de ser humano y de ratón.

Ejemplo 51

Caracterización bioquímica mediante resonancia de plasmón superficial de variantes de afinidad reducida de 16D5 y moléculas de unión de afinidad intermedia adicionales en el formato biespecífico de célula T

La unión de variantes de afinidad reducida de 16D5 anti-FolR1 y moléculas de unión de afinidad intermedia adicionales en el formato biespecífico de célula T al receptor 1 de folato recombinante humano, de cinomolgo y murino (todos como fusiones de Fc) se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un dispositivo Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, GE Healthcare). Las moléculas usadas para la determinación de la afinidad y la avidez se describen en la tabla 45.

Tabla 45: Nombre, descripción y referencia de figura de nueve construcciones usadas en el análisis SPR.

Nombre	Descripción	Referencia de figura
Variantes de afinidad reducida de 16D5 TCB 16D5 TCB 16D5 G49S/S93A TCB 16D5 G49S/K53A TCB 16D5 W96Y TCB 16D5 W96Y/D52E	formato invertido, biespecífico de célula T 2+1 (cadena ligera común)	Fig. 1 A
Moléculas de unión de afinidad intermedia TCB 36F2 TCB 6E10 TCB 14B1 TCB 9C7	crossfab, formato invertido, biespecífico de célula T 2+1	Fig. 1F

Inyecciones individuales

En primer lugar se analizaron los TCB anti-FolR1 mediante inyecciones individuales (tabla 46) para caracterizar su reactividad cruzada (con FolR1 humano, murino y de cinomolgo) y su especificidad (para FolR1 humano, FolR2 humano, FolR3 humano). Se acoplaron directamente fusiones a Fc monoméricas de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) de ser humano, cinomolgo y murino o de receptor 2 y 3 de folato humano (FolR2-Fc, FolR3-Fc) sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 300-400 UR. Los TCB se inyectaron durante 60 segundos a una concentración de 500 nM.

Tabla 46: Reactividad cruzada y especificidad de 7 moléculas biespecíficas de célula T para receptor 1 de folato. + significa unión, - significa sin unión, +/- significa unión débil.

Nombre del clon	Unión a huFolR1	Unión a cyFolR1	Unión a muFolR1	Unión a huFolR2	Unión a huFolR3
TCB 16D5	+	+	-	-	-
TCB 16D5 G49S/S93A	+	+	-	-	-
TCB 16D5 W96Y/D52E	+	+	-	-	-

TCB 36F2	+	+	+	+/-	-
TCB 6E10	+	+	-	-	-
TCB 14B1	+	+	+	+/-	-
TCB 9C7	+	+	-	-	-

Avidez por el receptor 1 de folato

La avidez de la interacción entre las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 47).

Las fusiones de Fc monoméricas biotiniladas recombinantes de receptor 1 de folato (FolR1-Fc) humano, de cinomolgo y murino se acoplaron directamente sobre una microplaca SA usando las instrucciones de acoplamiento convencionales (Biacore, GE Healthcare). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 200-300 UR. Las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 se pasaron a una concentración de 11,1 a 900 nM (para las variantes de afinidad reducida de 16D5) o de 0,2 a 500 nM (para las moléculas adicionales de afinidad intermedia y para 36F2) con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 180 segundos. La disociación se controló durante 240 o 600 segundos. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 30 s de glicina-HCl 10 mM pH 1,5. Las diferencias del índice refractivo en bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia inmovilizada con fusión de IL2R murino-Fc biotinilada recombinante (receptor fusionado a Fc no relacionado). Las curvas de unión resultantes de la unión bivalente de las moléculas biespecíficas de célula T se aproximaron a una unión 1:1 de Langmuir (aunque es una unión 1:2) y se ajustaron con ese modelo para obtener una KD aparente que representase la avidez de la unión bivalente. Las constantes de avidez aparentes para las interacciones procedieron de las constantes de velocidad del ajuste usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare).

Tabla 47: Unión bivalente (avidez con KD aparente) de moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 (TCB) a FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	**Ligando**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD aparente**
TCB 16D5	**huFolR1**	1,68E+05	4,33E-04	3 nM
	cyFolR1	2,08E+05	6,95E-04	3 nM
TCB 16D5 G49S/S93A	**huFolR1**	1,49E+05	2,09E-03	10 nM
	cyFolR1	4,54E+05	7,84E-03	20 nM

TCB 16D5 G49S/K53A	**huFolR1**	1,32E+05	5,86E-03	40 nM
	cyFolR1	3,73E+05	2,56E-02	70 nM
TCB 16D5 W96Y	**huFolR1**	1,15E+05	1,44E-03	10 nM
	cyFolR1	1,37E+05	1,68E-03	10 nM
TCB 16D5 W96Y/D52E	**huFolR1**	1,24E+05	1,40E-03	10 nM
	cyFolR1	5,17E+05	1,41E-02	30 nM
TCB 36F2	**huFolR1**	1,12E+06	7,90E-03	7 nM
	cyFolR1	1,97E+06	1,10E-02	6 nM
	muFolR1	5,54E+05	1,47E-03	3 nM
TCB 6E10	**huFolR1**	7,93E+06	8,74E-03	1 nM
	cyFolR1	5,56E+06	5,72E-03	1 nM
TCB 14B1	**huFolR1**	1,12E+06	1,40E-03	1 nM
	cyFolR1	1,02E+06	1,66E-03	2 nM
	muFolR1	8,03E+06	$8{,}20E^{-04}$	0,1 nM
TCB 9C7	**huFolR1**	1,18E+06	1,42E-03	1 nM
	cyFolR1	4,98E+06	4,82E-03	1 nM

3. Afinidad por el receptor 1 de folato

La afinidad de la interacción entre las moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 y los receptores de folato recombinantes se determinó tal como se describe a continuación (Tabla 48).

Para medir la afinidad, se acoplaron aproximadamente 12000 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo específico anti-Fab humano (kit de captura de Fab, GE Healthcare) sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (GE Healthcare). Se capturaron moléculas biespecíficas de célula T anti-FolR1 a 20 nM con un caudal de 10 µl/min durante 40 s, la celda de flujo de referencia se dejó sin captura. Se hicieron pasar diluciones en serie (12,3 a 3000 nM) de fusión de receptor 1 de folato humano, de cinomolgo o murino a Fc en todas las celdas de flujo a 30 µl/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 segundos y se activó cambiando de solución de muestra a HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró después de cada ciclo usando una inyección doble durante 60 s de glicina-HCl 10 mM pH 2,1. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Las constantes de afinidad para las interacciones se derivaron de las constantes de velocidad ajustando a una unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). Para las cinéticas de afinidad con fases de asociación y

disociación demasiado rápidas como para ajustarlas a un modelo de unión de Langmuir 1:1, se aplicó el modelo de análisis de estado estacionario usando el programa informático Bia Evaluation (GE Healthcare). El análisis de estado estacionario proporciona la KD de la reacción de unión en el equilibrio.

Tabla 48: Unión monovalente (afinidad) de moléculas biespecíficas de célula T (TCB) anti-FolR1 a FolR1 humano, de cinomolgo y murino.

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
TCB 16D5	**huFolR1**	1,22E+04	7,02E-04	57 nM
	cyFolR1	1,29E+04	1,71E-03	130 nM
TCB 16D5 G49S/S93A	**huFolR1**	1,01E+04	8,37E-03	830 nM
	cyFolR1	2,05E+04	8,60E-03	420 nM
TCB 16D5 G49S/K53A	**huFolR1**	9,17E+03	1,59E-02	1700 nM
	cyFolR1			1900 nM (análisis de estado estacionario)
TCB 16D5 W96Y	**huFolR1**	1,11E+04	4,05E-03	370 nM
	cyFolR1	1,17E+04	5,16E-03	440 nM
TCB 16D5 W96Y/D52E	**huFolR1**			1400 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			5600 nM (análisis de estado estacionario)
TCB 36F2	**huFolR1**			1400 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			1500 nM (análisis de estado estacionario)
	muFolR1	3,50E+04	1,73E-02	490 nM

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
TCB 6E10	**huFolR1**			1200 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			1500 nM (análisis de estado estacionario)
TCB 14B1	**huFolR1**	6,16E+04	3,03E-02	490 nM
	cyFolR1			1200 nM (análisis de estado estacionario)
	muFolR1	7,03E+04	2,28E-03	30 nM
TCB 9C7	**huFolR1**			840 nM (análisis de estado estacionario)
	cyFolR1			1400 nM (análisis de estado estacionario)

Las mutaciones introducidas en las moléculas de unión a 16D5 reducen su afinidad a FolR1 de ser humano y de cinomolgo tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial. La clasificación con afinidad descendente es 16D5 WT (57 nM)> W96Y (6,5 veces menor)> G49S/S93A (14,5 veces menor)> W96Y/D52E (24,5 veces menor)> G49S/K53A (30 veces menor). Se puede observar la misma clasificación en los valores de avidez, aunque las diferencias de número de veces son menores, 16D5 WT (3nM)> W96Y, G49S/S93A, W96Y/D52E (3 veces menor)> G49S/K53A (13 veces menor).

Las moléculas de unión de afinidad intermedia tienen la siguiente clasificación en cuanto a su afinidad 16D5 (57 nM)>14B1 (8,5 veces menor)> 9C7 (15 veces menor) > 6E10 (21 veces menor)>36F2 (24,5 veces menor). Estas diferencias, sin embargo, desaparecen en la medida de avidez, 14B1, 9C7, 6E10 (1nM)> 16D5 (3 nM) > 36F2 (7 nM).

El TCB 16D5 W96Y/D52E aborda los problemas observados con candidatos

anteriores. TCB 16D5 W96Y/D52E está basado en la molécula de unión 16D5 de cadena ligera común y tiene dos mutaciones puntuales en la cadena pesada respecto de la molécula de unión 16D5 progenitora. La mutación W96Y reduce la afinidad de la molécula de unión a FolR1 en comparación con la molécula de unión progenitora y la mutación D52E elimina el sitio de desamidación y también contribuye a la reducción de la afinidad. TCB 16D5 W96Y/D52E se une a FolR1 de ser humano y de cinomolgo, pero no a FolR1 murino. Es específico para FolR1 y no se une a FolR2 humano recombinante o a FolR3 humano. La afinidad (unión monovalente) de 16D5 W96Y/D52E es de aproximadamente 1,4 µM para FolR1 humano (24.5 veces menor que la molécula de unión 16D5 progenitora) y la avidez (unión bivalente) de aproximadamente 10 nM (3 veces menor que la molécula de unión 16D5 progenitora).

Ejemplo 52

Eliminación de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por TCB de FolR1 intermedios

La eliminación por células T mediada por moléculas de unión a FolR1 intermedias (CB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7), se evaluó en células Hela (FolR1 alto), SKov-3 (FolR1 medio) y HT-29 (FolR1 bajo). TCB 16D5 y TCB 36F2 se incluyeron como puntos de referencia. Se usaron PBMC humanos como efectores y se detectó la eliminación a las 24 h y 48 h de incubación con los anticuerpos biespecíficos. En resumen, las células diana se recogieron con tripsina/EDTA, se lavaron, y se emplacaron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhiriesen durante toda la noche. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de densidad Histopaque de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre fresca con PBS estéril y se dispuso en capas sobre un gradiente Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC se desechó y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo falcon rellenado posteriormente con 50 ml de PBS. La mezcla se centrifugó (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y el sedimento de PMBC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó de manera automática (ViCell) y se almacenó en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO_2 al 5 % en un incubador de células hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de eliminación, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 10 nM en triplicados). Los PBMC

se añadieron a las células diana a una relación E:T final de 10:1. La eliminación de células diana se evaluó tras 24 h y 48 h de incubación a 37 °C, CO_2 al 5 % mediante la cuantificación de LDH liberado en los sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). La lisis máxima de las células diana (= 100 %) se logró mediante incubación de las células diana con Triton X-100 al 1 %. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a las células diana incubadas conjuntamente con células efectoras sin construcción biespecífica.

Los resultados demuestran que la lisis tumoral inducida por las moléculas de unión a FolR1 intermedias (TCB 6E10, TCB 14B1 y TCB 9C7) varía entre la obtenida para el TCB 16D5 de alta afinidad y la del TCB 36F2 de baja afinidad (Fig. 36A-F). Entre las moléculas de unión a FolR1 intermedias, TCB 14B1 muestra la eliminación más fuerte, tal como se puede observar tras 48 h de incubación (Fig. 36D-F). Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación tras 24 h y 48 h de incubación, calculados usando GraphPadPrism6, se proporcionan en la tabla 49 y en la tabla 50.

Tabla 49: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por los TCB intermedios de FolR1 tras 24 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 6E10	6,5	n.d.	*n.d.
TCB 14B1	8,5	30,1	*n.d.
TCB 9C7	2,8	741,4	*n.d.
TCB 16D5	2,2	1,5	*n.d.
TCB 36F2	31,1	*n.d.	*n.d.

** No determinado*

Tabla 50: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por los TCB intermedios de FolR1 tras 48 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 6E10	2,1	2164,0	*n.d.
TCB 14B1	5,5	4,7	397,7

TCB 9C7	4,3	519,6	*n.d.
TCB 16D5	2,3	*n.d.	4,9
TCB 36F2	10,5	*n.d.	n.d.

** No determinado*

Ejemplo 53

Eliminación por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 inducida por las variantes de 16D5 de afinidad reducida

La eliminación por células T mediada por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5-G49S/K53A, TCB 16D5 W96Y, TCB 16D5 W96Y/D52E) se evaluó en células HeLa (FolR1 alto), SKov-3 (FolR1 medio) y HT-29 (FolR1 bajo). TCB 16D5 y TCB 36F2 se incluyeron como puntos de referencia. El ensayo se efectuó tal como se describe anteriormente (ejemplo 52).

Los resultados demuestran que la lisis tumoral inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5-G49S/K53A, TCB 16D5 W96Y, TCB 16D5 W96Y/D52E), varía entre la obtenida para el TCB 16D5 de alta afinidad y el TCB 36F2 de baja afinidad. Los valores de CE50 relacionados con los ensayos de eliminación tras 24 h y 48 h de incubación, calculados usando GraphPadPrism6, se proporcionan en la tabla 51 y en la tabla 52 (Fig. 37A-F).

Tabla 51: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 que expresan FolR1 inducida por TBC 16D5 y sus variantes de afinidad reducida tras 24 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 16D5	2,2	1,5	*n.d.
TCB 16D5-G49S/S93A	2,3	430,4	*n.d.
TCB 16D5-G49S/K53A	4,4	1701,9	*n.d.
TCB 16D5 W96Y	3,0	164,5	*n.d.
TCB 16D5 W96Y/D52E	1,3	235,4	*n.d.
TCB 36F2	31,1	*n.d.	*n.d.

** No determinado*

Tabla 52: Valores de CE50 (pM) para la eliminación mediada por células T de células HeLa, SKov-3 y HT-29 que expresan FolR1 inducida por TBC 16D5 y sus variantes de afinidad reducida tras 48 h de incubación.

	CE50 [pM]		
Anticuerpo	**Hela**	**SKov-3**	**HT-29**
TCB 16D5	2,3	0,1	4,9
TCB 16D5-G49S/S93A	0,9	95,9	99,3
TCB 16D5-G49S/K53A	0,5	950,4	1790,7
TCB 16D5 W96Y	1,8	24,7	99,3
TCB 16D5 W96Y/D52E	0,9	93,0	399,4
TCB 36F2	10,5	968,5	*n.d.

** No determinado*

Por lo tanto, al igual que con el TCB 36F2 FOLR1 descrito anteriormente, El TCB 16D5 W96Y/D52E diferencia entre células de alta y baja expresión, lo que es de especial importancia para reducir la toxicidad, y que las células de algunos tejidos normales, no tumorales expresan niveles muy bajos de FolR1 (aproximadamente menos de 1000 copias por célula). De manera coherente con esta observación, los resultados discutidos en el ejemplo 54 más adelante demuestran que el TCB 16D5 W96Y/D52E induce niveles mucho más bajos de eliminación mediada por células T de células primarias (Fig. 38A-F) en comparación con el TCB 16D5 progenitor. Como tales, los TCB 16D5 W96Y/D52E median una eliminación potente de tejidos tumorales con expresión alta o media de FolR1, pero no de tejidos normales con baja expresión. TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 comprende restos de unión a FolR1 de relativamente baja afinidad pero posee un efecto de avidez que permite diferenciar entre células con alta y baja expresión de FolR1. Debido a que las células tumorales expresan FolR1 a niveles elevados o intermedios, este TCB se une de manera selectiva a células tumorales y no a células normales no cancerosas que expresan FolR1 a niveles bajos o en absoluto. Como ventaja adicional frente al TCB de FolR1 36F2 descrito anteriormente, el TCB 16D5 W96Y/D52E se une específicamente a FolR1 y no a FolR2 o FolR3, potenciando adicionalmente su seguridad para tratamiento *in vivo*.

Además de las características ventajosas anteriores, el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato invertido bivalente 2+1 tiene también la ventaja de que no necesita

reticulación química u otra estrategia híbrida. Esto lo hace adecuado para la fabricación de un medicamento para tratar a pacientes, por ejemplo, pacientes que tienen tumores cancerosos positivos a FolR1. El TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato invertido bivalente 2+1 puede producirse usando procesos de CHO convencionales con bajos agregados. Además, el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 comprende secuencias humanas y humanizadas, haciéndolo superior a las moléculas que emplean polipéptidos de rata y murinos que son altamente inmunogénicos cuando se administran a seres humanos. Además, el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 se diseñó por ingeniería genética para suprimir la unión a FcgR y, como tal, no causa reticulación con FcgR y reacciones a la infusión, potenciando además su seguridad cuando se administra a pacientes.

Tal como se ha demostrado por los resultados descritos anteriormente, su geometría de cabeza a cola hace que el TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato invertido bivalente 2+1 sea una molécula altamente potente que induce la eliminación absoluta de la célula diana. Su bivalencia magnifica la avidez y la potencia, pero también permite diferenciar entre células con alta y baja expresión. Su preferencia por células de expresión alta o media de diana debido a su efecto de avidez reduce la toxicidad resultante de la eliminación mediada por células T de células normales que expresan FolR1 a niveles bajos.

Una ventaja adicional del TCB 16D5 W96Y/D52E en el formato bivalente 2+1 y otras realizaciones divulgadas en el presente documento es que su desarrollo clínico no necesita del uso de moléculas subrogadas ya que se unen a FolR1 humano y de cinomolgo. Como tales, las moléculas divulgadas en el presente documento reconocen un epítopo distinto al de los anticuerpos para FolR1 descritos anteriormente que no reconocían a FolR1 de ambas especies (véase también la Fig. 41).

Ejemplo 54

Eliminación por células T de células primarias inducida por variantes de 16D5 de afinidad reducida y TCB de FolR1 de afinidad intermedia

La eliminación por células T mediada por variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E) y la molécula de unión a FolR1 intermedia TCB 14B1 se evaluó en células primarias (células epiteliales corticales renales humanas (HRCEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 4110) y células epiteliales pigmentarias retinales humanas (HRPEpiC) (ScienCell Research Laboratories; n.º de cat. 6540)). Se incluyeron células HT-29 (FolR1 bajo) como línea celular de control. TCB 16D5 y TCB 36F2 se incluyeron como puntos de

referencia y TCB DP47 sirvió como control sin unión.

El ensayo se llevó a cabo tal como se describe en el ejemplo 52, con un intervalo de concentración de los anticuerpos de 0,1 pM – 100 nM (en triplicados).

Cuando se usan células primarias humanas como diana, la lisis general es mucho más baja debido a una velocidad de expresión menor de FolR1 en estas células (Fig. 38A-F). Para la molécula de unión a FolR1 de alta afinidad TCB 16D5 puede observarse una lisis mediada por células T en ambos tipos de células primarias empleados. Tal como se observó previamente cuando se usaron líneas celulares tumorales como diana, la lisis inducida por la molécula de unión a FolR1 intermedia TCB 14B1 y las variantes de 16D5 de afinidad reducida (TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E), varía entre la obtenida para el TCB 16D5 de alta afinidad y el TCB 36F2 de baja afinidad. La lisis significativamente reducida de las células que expresan FolR1 a bajos niveles es consistente con la baja actividad fuera de la diana y se espera que las variantes de 16D5 de baja afinidad TCB 16D5-G49S/S93A y TCB 16D5 W96Y/D52E, por lo tanto, se toleren bien *in vivo*.

Ejemplo 55

FC de una sola dosis de construcciones de TCB de FOLR1 en ratones NOG hembra

Se mantuvieron ratones NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) hembra de una media de edad de 8-10 semanas al inicio del experimento (comprados a través de Taconic, instalación SOPF) en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (ZH193/2014). Tras su llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

Se llevó a cabo un estudio farmacocinético de una sola dosis (SDPK) para evaluar la exposición de las construcciones de TCB de FolR1 (36F2, 16D5, 16D5 G49S/S93A y 16D5 W96Y/D52E). Se administró una administración de bolo i.v. de 0,5 mg/kg a ratones NOG y se extrajeron muestras de sangre en momentos seleccionados para la evaluación farmacocinética. Se analizaron mediante ELISA muestras de suero de ratón. Se añadieron paso a paso a-huCD3-CDR biotinilado (mAb<ID-mAb<CD3>>M-4.25.93-IgG-Bi), muestras de ensayo, anticuerpo a-huFc marcado con digoxigenina (mAb<H-FC pan>M-R10Z8E9-IgG-Dig) y anticuerpo de detección anti-digoxigenina (POD) a una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con estreptavidina y se incubaron después de cada etapa durante 1 h a temperatura ambiente. La placa

se lavó tres veces después de cada etapa para eliminar las sustancias no unidas. Finalmente, se visualizó el complejo unido a peroxidasa añadiendo solución de sustrato ABTS para formar un producto de reacción coloreado. La intensidad del producto de reacción, que se determina fotométricamente a 405 nm (con longitud de onda de referencia a 490 nm), es proporcional a la concentración de analito en la muestra de suero. El intervalo de calibración de la curva patrón para las construcciones es de 0,078 a 5 ng/ml, siendo 1,5 ng/ml el límite inferior de cuantificación (LIDC).

El estudio FCDU reveló un perfil FC similar a IgG para las construcciones 16D5, 16D5 W96Y/D52E y 16D5 G49S/S93A (Fig. 39A-B). Debido a esto, se seleccionó una pauta de una vez a la semana para el estudio de eficacia (Fig. 40B). La semivida para 36F2 es menor comparada con los demás clones. 36F2 es la única de las cuatro moléculas ensayadas que tiene reactividad cruzada con FolR1 de ratón, lo que puede explicar la menor semivida para esta molécula e indica una DFMD (disposición de fármaco mediada por diana).

Ejemplo 56

Eficacia *in vivo* de construcciones de TCB de FOLR1 (16D5, 16D5 G49S/S93A y 16D5 W96Y/D52E) tras la transferencia de PBMC humanos en ratones NOG portadores de HeLa

Las construcciones de TCB de FolR1 se ensayaron en la línea celular HeLa de cáncer de cuello de útero humano que expresan FolR1, inyectada por vía s.c. en ratones NOG a los que se les ha injertado PBMC.

Las células HeLa se obtuvieron originariamente de la ATCC (CCL2) y después de su expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche-Glycart. La línea celular de tumor se cultivó de manera rutinaria en RPMI que contenía FCS al 10 % (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con CO_2 al 5 %. El pase 13 se usó para trasplante, a una viabilidad > 95 %. Se inyectaron 1 x 10^6 células por animal por vía s.c. en el flanco derecho de los animales en un total de 100 µl de medio de cultivo celular RPMI (Gibco).

Se mantuvo a 60 ratones NOG hembra, de 8-10 semanas de edad al comienzo del experimento (criados en Taconic, Dinamarca) en condiciones libres de patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las guías institucionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por el gobierno local (ZH193/2014). Tras la llegada, se mantuvo a los animales durante una semana para acostumbrarse al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un control continuo de la salud de manera regular.

De acuerdo con el protocolo del estudio, se inyectó a los ratones por vía s.c, en el día 0 del estudio con 1 x 10^6 células HeLa. En el día 30 del estudio, cuando el tumor

alcanzó un tamaño de aproximadamente 150 mm3, se aislaron PBMC humanos de un donante sano mediante el método de Ficoll y se inyectaron 10 x 10^6 células por vía i.v. en los ratones portadores de tumores. Dos días después (día 32), se aleatorizó a los ratones y se distribuyeron de manera uniforme en seis grupos de tratamiento (n = 10) seguido de inyección por vía i.v. con 16D5 (0,5 mg/kg), 16D5 G49S/S93A (2,5 o 0,5 mg/kg) y 16D5 W96Y/D52E (2,5 o 0,5 mg/kg). Se inyectó a todos los grupos de tratamiento una vez a la semana durante un total de tres semanas. Se inyectaron a los ratones 200 µl de la solución adecuada. Se inyectó a los ratones en el grupo de vehículo con PBS. Para obtener la cantidad adecuada de TCB por cada 200 µl, las soluciones madre se diluyeron con PBS cuando fue necesario. El crecimiento tumoral se midió una vez a la semana usando un calibre (Figura 40C-E) y se calculó el volumen tumoral del modo siguiente:

V_T: (A2/2) x L (A: Anchura L: Longitud)

La inyección una vez a la semana de las construcciones de TCB de FolR1 dio como resultado una regresión tumoral significativa (Fig. 40C-E). La eficacia de 16D5 (0,5 mg/kg) y 16D5 W96Y/D52E16D5 (0,5 mg/kg) fue comparable, mientras que 16D5 G49S/S93A (0,5 mg/kg) mostró una potencia ligeramente menor. Las dosis mayores de 2,5 mg/kg de 16D5 W96Y/D52E16D5 y de 16D5 G49S/S93A no mostraron una eficacia aumentada en comparación con las dosis de 0,5 mg/kg. Para las lecturas FD, se sacrificó a los ratones en el día 52, se extirparon los tumores, se pesaron y se prepararon suspensiones de células individuales mediante una digestión enzimática con colagenasa V, dispasa II y DNasa para su posterior análisis FACS. Los tumores explantados de todos los grupos de tratamiento mostraron un peso tumoral significativamente menor a la terminación del estudio en comparación con los tumores de control de vehículo (Fig. 40F). Las suspensiones de células individuales de tumores se tiñeron para huCD45 y huCD3 y DAPI para la exclusión de células muertas y se analizaron en el dispositivo BD Fortessa. Los análisis FACS revelaron números estadísticamente mayores de células T humanas positivas a CD3 infiltradas en el tejido tumoral tras el tratamiento con 16D5 así como con 16D5 W96Y/D52E16D5 en comparación con los tumores de control de vehículo (Fig. 40C).

Ejemplo 57

Estudio de toxicidad en mono cinomolgo

Se efectúa un estudio farmacocinético (FC), farmacodinámico (FD) y de tolerabilidad para investigar la tolerabilidad, FC y efectos FD de una sola dosis intravenosa de TCB variantes de 16D5 de afinidad reducida (por ejemplo, TCB 16D5-G49S/S93A, TCB 16D5 W96Y/D52E) en monos cinomolgos. En este estudio, los monos cinomolgos no expuestos previamente, (1 mono macho y 1 mono hembra/grupo),

reciben una sola dosis intravenosa de TCB variante de 16D5 de afinidad reducida, que incluye TCB 16D5 W96Y/D52E, siguiendo un protocolo de escalado de la dosis. Los niveles de dosificación ejemplares incluyen 0,003, 0,03, y 0,09 mg/kg. Se evaluaron parámetros de toxicidad convencionales (signos clínicos, pesos corporales, química hematológica y clínica) y las cinéticas de los números de células T y su estado de activación en sangre y la cinética de liberación de citocinas. También se recogen muestras de sangre para FC durante un periodo de 28 días para medir los TCB variantes de 16D5 de afinidad reducida, que incluye TCB 16D5 W96Y/D52E, de anticuerpos anti-fármaco.

Secuencias de aminoácidos de realizaciones ejemplares

1) Moléculas de unión a FolR en formato de cadena ligera común, cadena pesada variable

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16A3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYAGVTPFDYWGQGTLVTVSS	1
18D3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYTGGSSAFDYWGQGTLVTVS	2
15H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYLFSTSFDYWGQGTLVTVSS	3
15B6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYIGIVPFDYWGQGTLVTVSS	4
21D1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYVGVSPFDYWGQGTLVTVSS	5

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16F12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNFTVLRVPFDYWGQGTLVTVSS	6
15A1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNYYIGVVTFDYWGQGTLVTVSS	7
15A1_CDR1	SYYMH	8
15A1_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
15A1_CDR3	NYYIGVVTFDY	10
19E5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEWRRYTSFDYWGQGTLVTVSS	11
19E5_CDR1	SYYMH	8
19E5_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19E5_CDR3	GEWRRYTSFDY	12
19A4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGWIRWEHFDYWGQGTLVTVSS	13
19A4_CDR1	SYYMH	8
19A4_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19A4_CDR3	GGWIRWEHFDY	14

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	15
16D5_CDR1	NAWMS	16
16D5_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
16D5_CDR3	PWEWSWYDY	18
15E12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSYFDYWGQGTLVTVSS	19
15E12_CDR1	NAWMS	16
15E12_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
15E12_CDR3	PWEWSYFDY	20
21A5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWAWFDYWGQGTLVTVSS	21
21A5_CDR1	NAWMS	16
21A5_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21A5_CDR3	PWEWAWFDY	22
21G8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWAYFDYWGQGTLVTVSS	23
21G8_CDR1	NAWMS	16

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
21G8_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21G8_CDR3	PWEWAYFDY	24
19H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARTGWSRWGYMDYWGQGTLVTVSS	25
19H3_CDR1	SYYMH	8
19H3_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19H3_CDR3	TGWSRWGYMDY	26
20G6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGEWIRYYHFDYWGQGTLVTVSS	27
20G6_CDR1	SYYMH	8
20G6_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
20G6_CDR3	GEWIRYYHFDY	28
20H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVGWYRWGYMDYWGQGTLVTVSS	29
20H7_CDR1	SYYMH	8
20H7_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
20H7_CDR3	VGWYRWGYMDY	30

2) cadena ligera común (CLC) de molécula de unión a CD3

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
cadena ligera de CD3 común (VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
cadena ligera CD3 común_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
cadena ligera CD3 común_CDR2	GTNKRAP	33
cadena ligera CD3 común_CDR3	ALWYSNLWV	34
cadena ligera de CD3 común (VLCL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	35

3) molécula de unión a CD3, cadena pesada

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
cadena pesada variable de CD3 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	36
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR1	TYAMN	37

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	38
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR3	HGNFGNSYVSWFAY	39
cadena pesada completa de CD3 (VHCH1)_	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	40
cadena pesada constante de CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	84

4) Moléculas de unión a FolR útiles para formato crossfab

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
11F8_VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYRAWYSFDYWGQGTTVTVSS	41
11F8_VH_CDR1	SYAIS	42
11F8_VH_CDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG	43
11F8_VH_CDR3	AVFYRAWYSFDY	44

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
11F8_VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYTSPPPTFGQGTKVEIK	45
11F8_VL_CDR1	RASQSISSWLA	46
11F8_VL_CDR2	DASSLES	47
11F8_VL_CDR3	QQYTSPPPT	48
36F2_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLVTVSS	49
36F2_VH_CDR1	SYYMH	8
36F2_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
36F2_VH_CDR3	SFFTGFHLDY	50
36F2_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYTNEHYYTFGQGTKVEIK	51
36F2_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
36F2_VL_CDR2	GASSRAT	53
36F2_VL_CDR3	QQYTNEHYYT	54

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
5D9_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSYIDMDYWGQGTLVTVSS	70
5D9_VH_CDR1	SYYMH	8
5D9_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
5D9_VH_CDR3	SYIDMDY	71
5D9_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDNWSPTFGQGTKVEIK	72
5D9_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
5D9_VL_CDR2	GASSRAT	53
5D9_VL_CDR3	QQDNWSPT	73
6B6_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVDMDYWGQGTLVTVSS	74
6B6_VH_CDR1	SYYMH	8
6B6_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
6B6_VH_CDR3	SYVDMDY	75
6B6_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDIWSPTFGQGTKVEIK	76
6B6_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
6B6_VL_CDR2	GASSRAT	53
6B6_VL_CDR3	QQDIWSPT	77
14E4_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSSYVEWYAFDYWGQGTLVTVSS	78
14E4_VH_CDR1	SYAMS	79
14E4_VH_CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG	80
14E4_VH_CDR3	DSSYVEWYAFDY	81
14E4_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDSTLTISRLEPEDFAVYYCQQPTSSPITFG QGTKVEIK	82
14E4_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
14E4_VL_CDR2	GASSRAT	53
14E4_VL_CDR3	QQPTSSPIT	83

5) molécula de unión a CD3 útil en formato crossfab

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
cadena pesada de CD3 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	36
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR1	TYAMN	37
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	38
cadena pesada variable de CD3 (VH)_CDR3	HGNFGNSYVSWFAY	39
cadena ligera de CD3 (VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
cadena ligera CD3_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
cadena ligera CD3_CDR2	GTNKRAP	33
cadena ligera CD3_CDR3	ALWYSNLWV	34

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
pETR12940: cadena ligera común de CD3 (VLCH1)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	86
cadena pesada de CD3 cruzada (VHC□); por ejemplo, en pCON1057	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWV RQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	87
CD3- CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	85
CD3-ckappa	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	88

6) **–** Secuencias de aminoácidos ejemplares de anticuerpos biespecíficos de CD3-FolR en formato 2+1 crossmab invertido

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VLCH1[CD3] pETR12940	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	86

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD	307
VHCH1[36F2]_VHCL[CD3]_Fc pomo_PGLALA pCON1056	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWV RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGG GGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF STYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	308
36F2-Fc agujero PGLALA pCON1050	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWV RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	309

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2 LC pCON1062	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYTNEHYYTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHXGLSSPVTKSFNRGEC	310
CD3 VLCH1 pETR12940	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	86

7) Secuencias de aminoácidos ejemplares de anticuerpos biespecíficos de CD3-FolR con cadena ligera común

VHCH1[16D5]_VHCH1[CD3]_Fcpomo pCON999	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	89

VHCH1[16D5]_Fcagujero pCON983	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSL SLSPGK	90
CD3_cadena ligera común pETR13197	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	35
VHCH1[CD3]_VHCH1[16D5]_Fcpomo_PGLALA pETR13932	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIK SKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKT EDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	91

CD3_Fcpomo_PGLALA pETR13917	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	92
Fc_agujero_PGLALA_HYRF pETR10755	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLS LSPGK	93
VHCL[CD3]_Fcpomo_PGLALA pETR13378	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	98

16D5 invertido 2+1 con N100A en CDR H3 pETR14096	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	99
16D5 invertido 2+1 con S100aA en CDR H3 pETR14097	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNY ATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVRHGNFGNAYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	100

cadena ligera de CD3 fusionada a CH1; Fc_PGLALA; pETR13862	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	101
16D5 VH fusionado a cadena kappa constante; pETR13859	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDY WGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	102
CD3 VH fusionado a cadena lambda constante; pETR13860	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNW VRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSSASPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS	103
IGHV1-46*01 (X92343), más elemento JH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSGGSFDYW GQGTLVTVSS	104
IGHV1-69*06 (L22583), más elemento JH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSGGSMDAWGQG TTVTVSS	105

IGHV3-15*01 (X92216), más elemento JH4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	106
IGHV3-23*01 (M99660), más elemento JH4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	107
IGHV4-59*01 (AB019438), más elemento JH4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	108
IGHV5-51*01 (M99686), más elemento JH4	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	109
anticuerpo específico de CD3 basado en la cadena ligera humanizada CH2527	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	110
hVK1-39 (JK4 elemento J)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK	111

VL7_46-13 (cadena ligera de anticuerpo anti-CD3 humanizado)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	112

8) Variantes 16D5 ejemplares con afinidad reducida

a. Variantes de cadena ligera ejemplares con afinidad reducida

Nombre	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
K53A aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSNYAN**WV QQKPGQAPRGLIG**GTNARAP**GTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC**ALWYSNLWV**FGGGTKLTVL	113
K53A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
K53A_VL_CDR2	GTNARAP	311
K53A_VL_CDR3	ALWYSNLWV	34
S93A aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSNYAN**WV QQKPGQAPRGLIG**GTNKRAP**GTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYC**ALWYANLWV**FGGGTKLTVL	114
S93A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
S93A_VL_CDR2	GTNKRAP	33
S93A_VL_CDR3	ALWYANLWV	312

b. Variantes de cadena pesada ejemplares con afinidad reducida

Nombre	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
S35H aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMH**WV RQAPGKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQ GTLVTVSSAS	115

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
S35H_VH_CDR1	NAWMH	313
S35H_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
S35H_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
G49S aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAPGKGLEWV**SRIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	116
G49S_VH_CDR1	NAWMS	16
G49S_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
G49S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
R50S aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAPGKGLEWVG**SIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	117
R50S_VH_CDR1	NAWMS	16
R50S_VH_CDR2	SIKSKTDGGTTDYAAPVKG	314
R50S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
W96Y aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAPGKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PYEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	118
W96Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W96Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W96Y_VH_CDR3	PYEWSWYDY	315

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W98Y aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WV RQAPGKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEYSWYDY**WGQ GTLVTVSSAS	119
W98Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W98Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W98Y_VH_CDR3	PWEYSWYDY	232

9) Realizaciones ejemplares adicionales generadas a partir de una biblioteca de presentación en fagos (CDR subrayadas)

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
90D7 aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**NYTIVVSPFDY**WGQG TLVTVSSAS	120
90D7_VH_CDR1	SYYMH	8
90D7_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
90D7_VH_CDR3	NYTIVVSPFDY	233
90C1 aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**NYFIGSVAMDY**WGQ GTLVTVSSAS	121
90C1_VH_CDR1	SYYMH	8
90C1_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
90C1_VH_CDR3	NYFIGSVAMDY	234

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
5E8 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GLTYSMDY**WGQGTL VTVSSAS	122
5E8_VH_ CDR1	SYYMH	8
5E8_VH_ CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
5E8_VH_ CDR3	GLTYSMDY	235
5E8 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC**MQALQIPNT**FGQGTKVEIKRT	123
5E8_VL_ CDR2	LGSNRAS	60
5E8_VL_ CDR3	MQALQIPNT	236
12A4 VH aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVR QAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YAYALDY**WGQGTLVTV SSAS	124
12A4_VH _CDR1	SYAMS	79
12A4_VH _CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG	80
12A4_VH _CDR3	YAYALDY	237
12A4 VL aa	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQ KPGQAPRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC**QQHGSSST**FGQGTKVEIKRT	125
12A4_VL _CDR1	RASQSVSSSYLA	52
12A4_VL _CDR2	GASSRAT	53
12A4_VL _CDR3	QQHGSSST	238

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
7A3 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GDFSAGRLMDY**WG QGTLVTVSSAS	126
7A3_VH_ CDR1	SYYMH	8
7A3_VH_ CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
7A3_VH_ CDR3	GDFSAGRLMDY	239
7A3 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPPIT**FGQGTKVEIKRT	127
7A3_VL_ CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
7A3_VL_ CDR2	LGSNRAS	60
7A3_VL_ CDR3	MQALQTPPIT	240
6E10 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WV RQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GDYNAFDY**WGHGTL VTVSSAS	128
6E10_VH _CDR1	SYYMH	8
6E10_VH _CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
6E10_VH _CDR3	GDYNAFDY	241
6E10 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC**MQAWHSPT**FGQGTKVEIKRT	129
6E10_VL _CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
6E10_VL _CDR2	LGSNRAS	60

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
6E10_VL_CDR3	MQAWHSPT	242
12F9 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GATYTMDY**WGQGTLVTVSSAS	130
12F9_VH_CDR1	SYYMH	8
12F9_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
12F9_VH_CDR3	GATYTMDY	243
12F9 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPIT**FGQGTKVEIKRT	131
12F9_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
12F9_VL_CDR2	LGSNRAS	60
12F9_VL_CDR3	MQALQTPIT	244

11) variantes de desaminación

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 VH_D52dE	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKT**E**GGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	248
16D5 VH_D52dQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKT**Q**GGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	249

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
CD3_VH N100A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFG**A**SYVSWFAY WGQGTLVTVSS	250
CD3_VH S100aA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGN**A**YVSWFAY WGQGTLVTVSS	251
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-N100A]-Fcpomo_PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGG SGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY AMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASY VSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	252

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5-Fcagujero-PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	253
CD3-CLC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	254
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-S100aA]-Fcpomo_PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGG SGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNAYVS WFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	255

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
CD3_VL CH1	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	259

12) TCB basados en Mov19 de realizaciones ejemplares (CDR subrayadas)

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11646 Mov19 VH-CH1-Fcagujero PG/LALA	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFT**GYFMN**WVK QSHGKSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQNFKD**KATLTVDKSSN TAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	136
pETR11647 Mov19 VH-CH1-CD3 VH-CL-Fcpomo PG/LALA	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFT**GYFMN**WVK QSHGKSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQNFKD**KATLTVDKSSN TAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS**GFTFNTYAMN**WV RQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYADSVKD**RFTISRD DSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR**HGNFGNSYVSWFA Y**WGQGTLVTVSAASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR	137

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
	GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
pETR11644 Mov19 LC	DIELTQSPASLAVSLGQRAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**W YHQKPGQQPKLLIY**RASNLEA**GVPTRFSGSGSKTDFTLN IHPVEEEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	138

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
Hu IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	245

13)TCB de FolR1 con moléculas de unión de afinidad intermedia (CDR de acuerdo con Kabat, subrayadas):

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 variante W96Y/D52E VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS<u>NAWMS</u>W VRQAPGKGLEWVG<u>RIKSKTEGGTTDYAAPVKG</u>RFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT<u>PYEWSWYDY</u> WGQGTLVTVSS	274
W96Y/D52E_VH CDR1	NAWMS	16
W96Y/D52E_VH CDR2	RIKSKTEGGTTDYAAPVKG	275

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W96Y/D52E_VH CDR3	PYEWSWYDY	315
16D5 variante W96Y/D52E VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
W96Y/D52E_CD3-VHCH1_Fc-pomo_PGLALA pETR14945	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	276

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W96Y/D52E_Fc-agujero_PGLALA_HYRF pETR14946	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSW VRQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTIS RDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLS LSPGK	277
14B1 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WV RQAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**GDYRYRYFDY**WG QGTLVTVSS	278
14B1 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQ KPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTIT GAQAEDEADYYC**NSRESPPTGLVV**FGGGTKLTVL	279

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14976	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYRYRYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	280
14B1[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14977	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYRYRYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	281

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1 LC [KK] Lambda constante pETR14979	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRESPPTGLVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSKKLQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	282
9C7 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQAPGQGLEWMGI**INPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GDWSYYMDY**WGQGTLVTVSS	283
9C7 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQARQTPT**FGQGTKVEIK	284
9C7[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14974	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDWSYYMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	285

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14975	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDWSYYMDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	286
9C7 LC [RK] pETR14980	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYL DWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	316

14) Secuencias de antígeno

Antígeno	Secuencia	SEC ID Nº
hu FolR1	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQT**RIAWARTELLNVCMN AKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHK DVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLG PWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYT CKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVL CNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVA RFYAAAM**SGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS	139

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
huFolR1 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM**VD**<u>**EQLYFQG**</u>GSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIFEAQKIEWHE**	140
Fcagujero	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	141
mu FolR1	MAHLMTVQLLLLVMWMAECAQSRA**TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNSCCSTNTSQEAHKDISYLYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDVPLCKEDCQQWWEDCQSSFTCKSNWHKGWNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTSAALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAEAM**SGAGLHGTWPLLCSLSLVLLWVIS	142

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
mu FolR1 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNSCCSTNTSQEAHKDISYLYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDVPLCKEDCQQWWEDCQSSFTCKSNWHKGWNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTSAALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAEAM**VD**EQLYFQG**GSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIFEAQKIEWHE**	143
cy FolR1	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPLLLSLALTLLWLLS	144
cy FolR1 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**RTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM**VD**EQLYFQG**GSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGG**LNDIFEAQKIEWHE**	145

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
hu FolR2	MVWKWMPLLLLLVCVATMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHK TKPGPEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLYN FNWDHCGKMEPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVN QSWRKERFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHR GWDWTSGVNKCPAGALCRTFESYFPTPAALCEGLWSHS YKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVARFYAAAMH VNAGEMLHGTGGLLLSLALMLQLWLLG	146
hu FolR2 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**TMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSP WKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPAC KRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVNQSWRKERFLDVPLC KEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHRGWDWTSGVNKCPA GALCRTFESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSRGSGRCI QMWFDSAQGNPNEEVARFYAAAMHV**VD**EQLYFQG**GSP KSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIF EAQKIEWHE**	147
hu FolR3	MAWQMMQLLLLALVTAAGSAQPR**SARARTDLLNVCMNA KHHKTQPSPEDELYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDT SRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWI RQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSN WHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLW SHSFKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVAKFYAA AMNAGAPSRGIIDS**	148

Antígeno	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
hu FolR3 ECD-AcTev-Fcpomo-marcador Avi	**SARARTDLLNVCMNAKHHKTQPSPEDELYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWIRQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSFKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVAKFYAAAMNAGAPSRGIIDS**VD**<u>**EQLYFQG**</u>GSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDIFEAQKIEWHE**	149
hu CD3	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWG**QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD**VMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI	150

15)Secuencias de nucleótidos de realizaciones ejemplares

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16A3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCACGCAACTACTACGCTGGTGTTACTCCGTTCGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	151

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
15A1	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACATCGGTGTTGTTACTTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	152
18D3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACACTGGTGGTTCTTCTGCTTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	153
19E5	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGNTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGAATGGCGTCGTTACACTTCTTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	154

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
19A4	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGGTTGGATCCGTTGGGAACATTTCGACTAT TGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	155
15H7	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACCTGTTCTCTACTTCTTTCGACTATTG GGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	156
15B6	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAGGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACATCGGTATCGTTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	157

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	158
15E12	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCNGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACCGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTACTTCGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	159
21D1	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTACGTTGGTGTTTCTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	160

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16F12	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGNTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCNTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTTCACTGTTCTGCGTGTTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	161
21A5	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGGCTTGGTTCGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	162
21G8	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACCGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCTTGGGAATGGGCTTACTTCGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	163

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
19H3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCACTGGTTGGTCTCGTTGGGGTTACATGGACTATT GGGGCCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	164
20G6	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGAATGGATCCGTTACTACCATTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	165
20H7	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGTTGGTTGGTACCGTTGGGGTTACATGGACTAT TGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	166

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
11F8_VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCCGGAGGCACATTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGG GTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGAT GGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTAACCATTACTGCA GACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGT GCGAGAGCTGTTTTCTACCGTGCTTGGTACTCTTTCG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCT CA	167
11F8_VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTG CCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACG TTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCT CACCATCAGCAGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAACT TATTACTGCCAACAGTATACCAGCCCACCACCAACGT TTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG	168
36F2_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCATG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTGGG GTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	169

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC AGTGTATTACTGTCAGCAGTATACCAACGAACATTAT TATACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	170
5D9_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTACATCGACATGGACTATTGGGGTCAAGGC ACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	177
5D9_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC AGTGTATTACTGTCAGCAGGATAACTGGAGCCCAAC GTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	178

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
6B6_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTACGTTGACATGGACTATTGGGGTCAAGGC ACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	179
6B6_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACCTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC AGTGTATTACTGTCAGCAGGATATTTGGAGCCCAACG TTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	180
14E4_VH	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGC GAAAGACTCTTCTTACGTTGAATGGTACGCTTTCGAC TACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	181

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
14E4_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCCAACCAGCAGCCCAATTACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	182
Cadena pesada de CD3 (VHCH1)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGC	183

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
Cadena pesada de CD3 cruzada (VHC□)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCC TCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGA AAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACA ATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATC TGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTC CCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGATTAT GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGT	184
Cebador GAB7734 de mutagénesis N95Q	GCAGGCAAGCATTATGCAGCGGACTTTTGGTCAAGG	185
Cebador GAB7735 de mutagénesis N95S	CAGGCAAGCATTATGAGCCGGACTTTTGGTCAAGG	186

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
Cebador GAB7736 de mutagénesis T97A	CATTATGAACCGGGCTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC	187
Cebador GAB7737 de mutagénesis T97N	CATTATGAACCGGAATTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC	188

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VHCH1[16D5]_VHCH1[CD3]_Fcpomo_PGLALA pCON999 (TCB invertido con 16D5 2+1: pCON999 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCT GGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGT CCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCA AGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCAC GGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCT ACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC GCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCA CCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCT CTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC TCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG	189

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VHCH1[16D5]_Faguj ero_PGLA LA_HYRF pCON983	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTG GCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCGCTTCACGCAGAAGAGCCTCT	190

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
CD3_cadena ligera común pETR13197	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGT GTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAG TTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAA CTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAG GACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGC ACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGA AAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAA GATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGC AACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTCCTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACC CTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAAC AAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTAC CCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAG CAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCC CCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCA GCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGC CACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGG CAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGT GCAGC	191

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VHCH1[CD3]_VHCH1[16D5]_Fcpomo_PGLALA pETR13932 (TCB clásico con 16D5; 2+1: pETR13932+ pCON983+ pETR13197)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCATCTGCTAGCACAAAGGGCCCT AGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACA AGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAA CAGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCC CTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGA GCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGG ATCCGAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCT GGTAAAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGC GGCTTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAG CTGGGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGT GGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCA CCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTAC CATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTG CAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCT ACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACG ATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTA GCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGG CACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCC GCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTG CCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTA	192

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VHCH1[CD3]_Fcpomo_PGLALA pETR13719 (formato de IgG de 16D5, 1+1: pETR13719 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA	193

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
Fc_agujero_PGLALA_HYRF pETR10755 (16D5 cabeza a cola, 1+1: pCON999 + pETR10755 + pETR13197)	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCG CTTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A	194

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
	CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTG TCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCC TTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACC CTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAG TTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA	
	TCCGGGTAAA	

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
VLCH1[CD3] pETR12940	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGT GTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAG TTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAA CTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAG GACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGC ACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGA AAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAA GATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGC AACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTTCCGTG TTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAG GCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATT TTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCT GCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT	198

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5 invertido 2+1 con N100A en CDR H3 pETR14096 (pETR14096 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCT GGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGT CCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCA AGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCAC GGCAACTTCGGCGCCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCC TACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC GCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCA CCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCT CTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC TCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG	200

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5 invertido 2+1 con S100aA en CDR H3 pETR14097 (pETR14097 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCC AGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCT GGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGG CGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGT CCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG CACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCA AGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCAC GGCAACTTCGGCAACGCCTATGTGTCTTGGTTTGCCT ACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC GCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCA CCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCT CTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC TCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG	201

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº
cadena ligera de CD3 fusionada a CH1; Fc_PGLALA; pETR13862 (anticuerpo Kappa-lambda con cadena ligera común de CD3 fusionada a CH1 + Fc_PGLALA. VH fusionadas a cadena constante kappa o lambda pETR13859 + pETR13860 + pETR13862)	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGT GTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAG TTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAA CTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAG GACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGC ACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGA AAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAA GATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGC AACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACC TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC	202

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
16D5 VH fusionado a cadena kappa constante; pETR13859	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTA AAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC TTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTG GGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGG TTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCAC GGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATT TCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGA TGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTA CTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTAT TGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCT AGCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCT TCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTC GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC GGCAACAGCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTC CAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGAC CCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA CGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCC CGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGC	203

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
CD3 VH fusionado a cadena lambda constante; pETR13860	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGC CTCCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCCATGAACTG GGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGG TGTCCCGGATCAGATCCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCTCTCGGGACGACTCCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACTCC TATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCATCTGCTAGCCCCAAGGCTGCC CCCAGCGTGACCCTGTTTCCCCCCAGCAGCGAGGAA CTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATC AGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGG AGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGT ACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAG CAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTG ACCCACGAGGGCAGCACC GTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	204

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
VHCH1[36F2]_VHCL[CD3]_Fcpomo_PGLALA pCON1056	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCATGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCACGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGAT	246

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2-Fc agujero PGLALA pCON1050	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCATG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTGGG GTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCAC CAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCA GCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACC GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA	247

Descripción	**Secuencia**	**SEC ID Nº**
36F2 LC pCON1062	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCnA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATACCAACGAACATTA TTATACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCANGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	97
CD3 VLCH1 pETR12940	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGT GTCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAG TTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAA CTGGGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAG GACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGC ACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGA AAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAA GATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGC AACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTTCCGTG TTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAG GCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATT TTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCT GCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT	198

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
K53A nt	CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTG TCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGT TCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGG ACTGATCGGCGGCACCAACGCCAGAGCCCCTGGCA CCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAA AGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGTGCAGCCTGAAG ATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCA ACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTCCTA	205
S93A nt	CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTG TCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGT TCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGG ACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGCAC CCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAA GGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGTGCAGCCTGAAGA TGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACGCCAA CCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGT CCTA	206

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
S35H nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGCACTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACC ACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTTGGTAC GACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCC TCTGCTAGC	207

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
G49S nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGTCCCGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACCA CCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTTGGTACG ACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCCT CTGCTAGC	208
R50S nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGATCTATCAAGAGCAAGACCGACGGCGGCACCA CCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTTGGTACG ACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCCT CT GCTAGC	209
W96Y nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACC ACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGGTAC GACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCA TCT GCTAGC	210

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W98Y nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTG GGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGG TGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGATGGCGGCACC ACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTACTCTTGGTAC GACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCA TCT GCTAGC	211

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
90D7 nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACACTATCGTTGTTTCTCCGTTCGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTA GC	212
90C1 nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCAACTACTTCATCGGTTCTGTTGCTATGGACTATT GGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTA GC	213

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
5E8 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTCTGACTTACTCTATGGACTATTGGGGTCAA GGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	214
5E8 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGG TGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTT CCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACT ATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCC CTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTT CCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCG GCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGC AGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCACT GCAGATTCCAAACACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC GAAATTAAACGTACG	215
12A4 VH nt	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGC GAAATACGCTTACGCTCTGGACTACTGGGGCCAAGG AACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGC	216

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
12A4 VL nt	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCATGGCAGCAGCAGCACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAACGTACG	217
7A3 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTTCTCTGCTGGTCGTCTGATGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	218
7A3 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCACTGCAGACCCCACCAATTACCTTTGGTCAAGGCACCAAGGTCGAAATTAAACGTACG	219

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
6E10 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGACTACAACGCTTTCGACTATTGGGGTCAC GGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	220
6E10 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGG TGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTT CCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACT ATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCC CTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTT CCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCG GCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGC AGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCATG GCATAGCCCAACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTCGA AATTAAACGTACG	221
12F9 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAA AACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCAT CCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGT TCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGG GCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACG CGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCGTG ACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCCAG CCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGTGCA CGCGGTGCTACTTACACTATGGACTATTGGGGTCAA GGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	222

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
12F9 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCACTGCAGACCCCAATTACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTCGAAATTAAACGTACG	223
Nombre	**Secuencia**	**SEC ID Nº**

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11646 Mov19 VH-CH1-Fcagujero PG/LALA	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGT GAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGGC CAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTTCATGAACTG GGTCAAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGGAATGGAT CGGCAGAATCCACCCCTACGACGGCGACACCTTCTA CAACCAGAACTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGT GGACAAGAGCAGCAACACCGCCCACATGGAACTGCT GAGCCTGACCAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG CACCAGATACGACGGCAGCCGGGCCATGGATTATTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCCAGCGCTA GCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCA GCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTC TAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA	224

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11647 Mov19 VH-CH1-CD3 VH-CL-Fcpomo PG/LALA	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGT GAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGGC CAGCGGCTACAGCTTCACCGGCTACTTCATGAACTG GGTCAAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGGAATGGAT CGGCAGAATCCACCCCTACGACGGCGACACCTTCTA CAACCAGAACTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGT GGACAAGAGCAGCAACACCGCCCACATGGAACTGCT GAGCCTGACCAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG CACCAGATACGACGGCAGCCGGGCCATGGATTATTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCCAGCGCTA GCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTG GGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTG ACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGC AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAG GTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTC CGGAGGCGGAGGATCCGAAGTGCAGCTGGTGGAAA GCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTAAGGGCTCTCTG AAGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAAC ACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGG CAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGAAGCAA GTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGT GAAGGACCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCC AGAGCATCCTGTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAAC CGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGTGCGGCACG GCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTA CTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACAGTGTCTGCTG CTAGCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCC ATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGT CGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCT AAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCC GGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCC AAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACA CTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG	225

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
pETR11644 Mov19 LC	GACATCGAGCTGACCCAGAGCCCTGCCTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGACAGAGAGCCATCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGTCCTTTGCCGGCACCTCTCTGATGCACTGGTATCACCAGAAGCCCGGCCAGCAGCCCAAGCTGCTGATCTACAGAGCCAGCAACCTGGAAGCCGGCGTGCCCACAAGATTTTCCGGCAGCGGCAGCAAGACCGACTTCACCCTGAACATCCACCCCGTGGAAGAAGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAGAGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	226

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 VH_D52dE	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGAGGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	261

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 VH_D52dQ	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAA AACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTT CCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGT TCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGG TCGTATCAAGTCTAAAACTCAGGGTGGCACCACGGAT TACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCG CGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACT CTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACT ACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCC AGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	262
CD3_VH N100A	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGG TGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGT CCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTA CTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATG AACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCGCCAGCTATGTGT CTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGAC CGTGTCAAGC	263
CD3_VH S100aA	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGG TGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGT CCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTA CTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATG AACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACGCCTATGTGTC TTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACC GTGTCAAGC	264

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-N100A]-Fcpomo_PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAA AACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTT CCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGT TCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGG TCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGAT TACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCG CGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACT CTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACT ACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCC AGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCACAAA GGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCT CGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCT TGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACT TTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA GAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAG GATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAAC TGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCAT CAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCGCCAGCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGT GTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGC GGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCA CCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATAT CTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCG ATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCA	265

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5-Fcagujero-PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAA AACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTT CCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGT TCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGG TCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGAT TACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCG CGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACT CTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACT ACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCC AGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCACCAA GGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	266

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
CD3-CLC	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTG TCTCCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTT CTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTG GGTGCAGGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACT GATCGGCGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCC TGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCC GCCCTGACACTGTCTGGCGCCCAGCCAGAAGATGAG GCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGT GGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTCCTAG GTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCC CCCCAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCAC CCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC GTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTG AAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAG AGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCC TGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACA GCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGA AAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	267

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 [VHCH1]-CD3[VHCH1-S100aA]-Fcpomo_PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAA AACCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTT CCGGATTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGT TCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGG TCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGAT TACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCG CGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGATGAACT CTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTACT ACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCC AGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGCACAAA GGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCT CGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCT TGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACT TTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA GAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAG GATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAAC TGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGTCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCA CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCAT CAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACGCCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGT GTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGC GGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCA CCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATAT CTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCG ATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCA	268

Variante	Secuencia	SEC ID Nº
	CCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCT GGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTG AAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA	

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
16D5 variante W96Y/D 52E VH	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGG GTGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGAGGGCGGCAC CACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGG TACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGT GTCATCT	287

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W96Y/D52E-_CD3-VHCH1_Fc-pomo_PGLALA pETR14945	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGG GTGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGAGGGCGGCAC CACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGG TACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGT GTCATCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCC TCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAA CAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGC CCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCT GCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCC TAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAG GGTCCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTG GAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATC TCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCC CTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGA AGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGAC AGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGA CAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGC GGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGT TTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTG TCAAGCGCT AGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACC CAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCTC TGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCC	288

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
W96Y/D52E_Fc-agujero_PGLALA_HYRF pETR14946	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGT GAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGG GTGGGACGGATCAAGAGCAAGACCGAGGGCGGCAC CACCGACTATGCCGCCCCTGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTTGG TACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGT GTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCA CAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCT GCAGAGTTCT GGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCC TTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC	289

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1 VH	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCGTTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA GT	290
14B1 VL	TCTTCTGAACTGACTCAAGATCCAGCTGTTAGCGTG GCTCTGGGTCAGACTGTACGTATCACCTGCCAAGGC GATTCTCTGCGCTCCTACTACGCAAGCTGGTACCAG CAGAAACCGGGTCAGGCCCCAGTTCTGGTGATTTAC GGCAAAAACAACCGTCCGTCTGGGATCCCGGACCG TTTCTCCGGCAGCTCTTCCGGTAACACGGCGAGCCT CACCATCACTGGCGCTCAAGCAGAAGACGAGGCCG ACTATTACTGTAACTCTCGGGAAAGCCCACCAACCG GCCTGGTTGTCTTCGGTGGCGGTACCAAGCTGACC GTCCTA	291

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14976	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCGTTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA GTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGG CCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACTGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGC CCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCTCTGACCT CCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCT CCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGC CCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACG AGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACGGTGGCGGA GGTTCCGGAGGCGGAGGATCCCAGGCTGTCGTGAC CCAGGAACCCTCCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCA CCGTGACCCTGACCTGTGGATCTTCTACCGGCGCTG TGACCACCTCCAACTACGCCAATTGGGTGCAGGAAA AGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGC ACCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTC TCCGGTTCTCTGCTGGGCGGCAAGGCTGCCCTGAC TCTGTCTGGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGT ACTACTGCGCCCTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGT TCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGTCCAGC GCTTCCACCAAGGGACCCAGTGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCTCCAAGTCTACATCCGGTGGCACAGCTGCC CTGGGATGTCTCGTGAAGGACTACTTTCCTGAGCCT GTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAG CGGAGTGCACACATTCCCTGCAGTGCTGCAGAGCA GCGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTCGTGACCGTG CCTTCCTCTAGCCTGGGAACACAGACATATATCTGTA ATGTGAATCATAAGCCCAGTAATACCAAAGTGGATAA GAAAGTGGAACCTAAGAGCTGCGATAAGACCCACAC	292

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14977	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCGTTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGA GTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGC CGCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCG AGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTG ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA GAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCAC CGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACGAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT CTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	293

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
14B1 LC [KK] Lambda constante pETR14979	TCTTCTGAACTGACTCAAGATCCAGCTGTTAGCGTG GCTCTGGGTCAGACTGTACGTATCACCTGCCAAGGC GATTCTCTGCGCTCCTACTACGCAAGCTGGTACCAG CAGAAACCGGGTCAGGCCCCAGTTCTGGTGATTTAC GGCAAAAACAACCGTCCGTCTGGGATCCCGGACCG TTTCTCCGGCAGCTCTTCCGGTAACACGGCGAGCCT CACCATCACTGGCGCTCAAGCAGAAGACGAGGCCG ACTATTACTGTAACTCTCGGGAAAGCCCACCAACCG GCCTGGTTGTCTTCGGTGGCGGTACCAAGCTGACC GTCCTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGAC CCTGTTCCCCCCCAGCAGCAAGAAACTGCAGGCCAA CAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTA CCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACA GCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACC CCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAG CAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGA GCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAG GGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGA GTGCAGC	294
9C7 VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAA AAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCA TCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGG TTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATG GGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTAC GCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCG TGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCC AGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGT GCACGCGGTGACTGGTCTTACTACATGGACTATTGG GGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	295

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7 VL	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGG TGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTT CCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACT ATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCC CTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTT CCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCC GGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAA GCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCA CGGCAGACCCCAACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC GAAATTAAA	296

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-pomo_PGLALA pETR14974	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAA AAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCA TCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGG TTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATG GGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTAC GCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCG TGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCC AGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGT GCACGCGGTGACTGGTCTTACTACATGGACTATTGG GGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCCTTCC AGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACTGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGAC CGTGTCCTGGAATTCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCT GTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACGAGAAGG TGGAACCCAAGTCCTGCGACGGTGGCGGAGGTTCC GGAGGCGGAGGATCCCAGGCTGTCGTGACCCAGGA ACCCTCCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACCGTGAC CCTGACCTGTGGATCTTCTACCGGCGCTGTGACCAC CTCCAACTACGCCAATTGGGTGCAGGAAAAGCCCGG CCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACA AGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCTCCGGTT CTCTGCTGGGCGGCAAGGCTGCCCTGACTCTGTCT GGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTACTG CGCCCTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTCGGCG GAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGTCCAGCGCTTCC ACCAAGGGACCCAGTGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CTCCAAGTCTACATCCGGTGGCACAGCTGCCCTGGG ATGTCTCGTGAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGAC AGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGAG TGCACACATTCCCTGCAGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTATAGCCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCC TCTAGCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTGA ATCATAAGCCCAGTAATACCAAAGTGGATAAGAAAGT GGAACCTAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCC	297

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7[EE]_Fc-agujero_PGLALA pETR14975	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAA AAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCA TCCGGATACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGG TTCGTCAAGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATG GGCATCATTAACCCAAGCGGTGGCTCTACCTCCTAC GCGCAGAAATTCCAGGGTCGCGTCACGATGACCCG TGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATGGAGCTGTCC AGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTACTGT GCACGCGGTGACTGGTCTTACTACATGGACTATTGG GGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGG GCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTC TAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	298

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº
9C7 LC [RK] pETR14980	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGACTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGGCACGGCAGACCCCAACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTCGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	299

* * *

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención- Las divulgaciones de toda bibliografía de patente y científica citadas en el presente documento se incorporan expresamente en su integridad por referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> MOLECULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO BIESPECÍFICAS ACTIVADORAS DE CÉLULAS T QUE SE UNEN A CD3 Y AL RECEPTOR 1 DE FOLATO (FOLR1)

<130> 32186

<140>
<141>

<150> EP14194147.6
<151> 2014-11-20

<160> 316

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Ala Gly Val Thr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 2

<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

```
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Leu Phe Ser Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Ile Gly Ile Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 5
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Val Gly Val Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

```
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 7

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Ile Gly Val Val Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
```

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 8
Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 9
Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 10
Asn Tyr Tyr Ile Gly Val Val Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Trp Arg Arg Tyr Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 12
Gly Glu Trp Arg Arg Tyr Thr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30


Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45


Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60


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


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


Ala Arg Gly Gly Trp Ile Arg Trp Glu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110


Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
      sintético"

<400> 14
Gly Gly Trp Ile Arg Trp Glu His Phe Asp Tyr
1               5                   10


<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
      sintético"

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


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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 16
Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 17
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 18
Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 20
Pro Trp Glu Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ala Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 22
Pro Trp Glu Trp Ala Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 24
Pro Trp Glu Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 25
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Gly Trp Ser Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 26
Thr Gly Trp Ser Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1   5   10   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20   25   30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35   40   45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50   55   60

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

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

Ala Arg Gly Glu Trp Ile Arg Tyr Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100   105   110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
      sintético"

<400> 28
Gly Glu Trp Ile Arg Tyr Tyr His Phe Asp Tyr
1   5   10

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
      sintético"

<400> 29
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1   5   10   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Gly Trp Tyr Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 30
Val Gly Trp Tyr Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 31
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 32
Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 33
Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 34
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 35
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
            20                  25                  30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
        35                  40                  45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65                  70                  75                  80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85                  90                  95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
            100                 105                 110

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

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
                165                 170                 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
            180                 185                 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
        195                 200                 205
```

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 36
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 36
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 37
Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 38
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 39
His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 40
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
            100                 105                 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys
225
```

<210> 41
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
```

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50   55   60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115   120

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
      sintético"

<400> 42
Ser Tyr Ala Ile Ser
1   5

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
      sintético"

<400> 43
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1   5   10   15

Gly

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 44
Ala Val Phe Tyr Arg Ala Trp Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 46
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 47

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 47
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 48
Gln Gln Tyr Thr Ser Pro Pro Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 49
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr His Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Phe Phe Thr Gly Phe His Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 50
Ser Phe Phe Thr Gly Phe His Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 51
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asn Glu His
85 90 95

Tyr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 52
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 53
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 54
Gln Gln Tyr Thr Asn Glu His Tyr Tyr Thr
1 5 10

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 59
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencua Artificial: Péptido sintético"

<210> 70
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 70
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Tyr Ile Asp Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 71
Ser Tyr Ile Asp Met Asp Tyr
1 5

<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 72
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asn Trp Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 73
Gln Gln Asp Asn Trp Ser Pro Thr
1 5

<210> 74
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 74
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1   5   10   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20   25   30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35   40   45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50   55   60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
        115

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
      sintético"

<400> 75
Ser Tyr Val Asp Met Asp Tyr
1   5

<210> 76
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
      sintético"

<400> 76
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1   5   10   15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ile Trp Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 77
Gln Gln Asp Ile Trp Ser Pro Thr
1 5

<210> 78
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 78
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ser Ser Tyr Val Glu Trp Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 79
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 80
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 81
Asp Ser Ser Tyr Val Glu Trp Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 82
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 83
Gln Gln Pro Thr Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

<210> 84
<211> 103
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
100

<210> 85
<211> 103
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 85
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
100

<210> 86
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 86
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 87
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 87
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 88
<211> 105
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 88
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1 5 10 15

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
35 40 45

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 89
<211> 689
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 89

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

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460
```

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                565                 570                 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            580                 585                 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        595                 600                 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    610                 615                 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625                 630                 635                 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                645                 650                 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            660                 665                 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        675                 680                 685

Lys
```

<210> 90
<211> 450

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 90

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

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

```
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly Lys
    450
```

<210> 91

<211> 689
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 91

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
            100                 105                 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
```

210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
225 230 235 240

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
260 265 270

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
275 280 285

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
290 295 300

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu
305 310 315 320

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
325 330 335

Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
370 375 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385 390 395 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
405 410 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
420 425 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
435 440 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
450 455 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465 470 475 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
485 490 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
500 505 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
515 520 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 92
<211> 455
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 92

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
            100                 105                 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220
```

```
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 93
<211> 227

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 93

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 97
<211> 648
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
<221> base_modificada
<222> (603)..(603)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 97
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatacca acgaacatta ttatacgttc 300

ggccagggga ccaaagtgga aatcaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 360

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600

canggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 98
<211> 459
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 98
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
            100                 105                 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
        115                 120                 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
    130                 135                 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145                 150                 155                 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
                165                 170                 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
        195                 200                 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
    210                 215                 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225                 230                 235                 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
                245                 250                 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
            260                 265                 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
```

275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 99
<211> 689
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 99
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

```
            20                  25                  30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
            260                 265                 270
```

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

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

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

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

Asn Phe Gly Ala Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525
```

```
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                565                 570                 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            580                 585                 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        595                 600                 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    610                 615                 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625                 630                 635                 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                645                 650                 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            660                 665                 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        675                 680                 685

Lys
```

<210> 100
<211> 689
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 100

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

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

```
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Phe Gly Asn Ala Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
```

530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 101
<211> 441
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 101
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

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

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 102
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 102
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
165 170 175

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 103
<211> 231
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 103
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
            100                 105                 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro
        115                 120                 125

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
    130                 135                 140

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
145                 150                 155                 160

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
                165                 170                 175

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
            180                 185                 190

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
        195                 200                 205

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
    210                 215                 220

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225                 230
```

<210> 104
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 104
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 105
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 106
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 106
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 107
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 108
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 109
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 110

<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 110
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 111
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 111
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 112
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 112
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 113
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 113
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Ala Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 114
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 114
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ala Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 115
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 115
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 116
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 116
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 117
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 117
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ser Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 118
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 119
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 119
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Tyr Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 120
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 120
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Tyr Thr Ile Val Val Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 121
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 121
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Tyr Phe Ile Gly Ser Val Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 122
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 122
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Thr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 123
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 123
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Ile Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr

<210> 124
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 124
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 125
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 125
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Gly Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 126
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 126
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Phe Ser Ala Gly Arg Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 127
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 127
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr
115

<210> 128
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 128
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 129
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 129
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Trp His Ser Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr

<210> 130
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 130
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Thr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 131
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 131
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr

<210> 136
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 136
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 137
<211> 691
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 137
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

```
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
                245                 250                 255

Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
            260                 265                 270

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
        275                 280                 285

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

Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu
305                 310                 315                 320
```

```
Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
                325                 330                 335

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            340                 345                 350

Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
        355                 360                 365

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
    370                 375                 380

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
385                 390                 395                 400

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
                405                 410                 415

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
            420                 425                 430

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
        435                 440                 445

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    450                 455                 460

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                485                 490                 495

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            500                 505                 510

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        515                 520                 525

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    530                 535                 540

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
545                 550                 555                 560

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
                565                 570                 575
```

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
580 585 590

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
595 600 605

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
610 615 620

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
625 630 635 640

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
645 650 655

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
660 665 670

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
675 680 685

Pro Gly Lys
690

<210> 138
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 138
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

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

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

```
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
                85                  90                  95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 139
<211> 257
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

```
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1               5                   10                  15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
            20                  25                  30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
        35                  40                  45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
    50                  55                  60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65                  70                  75                  80
```

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

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

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 140
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 140
Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala
1 5 10 15

```
Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln
            20                  25                  30

Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln
        35                  40                  45

Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His
    50                  55                  60

Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr
65                  70                  75                  80

Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val
                85                  90                  95

Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys
            100                 105                 110

Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys
        115                 120                 125

Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys
    130                 135                 140

Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr
145                 150                 155                 160

Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser
                165                 170                 175

Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro
            180                 185                 190

Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala
        195                 200                 205

Met Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270
```

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
450 455 460

Glu Trp His Glu
465

<210> 141
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 141
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 142

<211> 255
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 142

```
Met Ala His Leu Met Thr Val Gln Leu Leu Leu Leu Val Met Trp Met
1               5                  10                  15

Ala Glu Cys Ala Gln Ser Arg Ala Thr Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu
        35                  40                  45

Asp Asn Leu His Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Thr Asn Ser Cys Cys
    50                  55                  60

Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Thr Met Thr Ser Glu Cys Lys Arg
                85                  90                  95

His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly
            100                 105                 110

Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu
        115                 120                 125

Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys
    130                 135                 140

Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
145                 150                 155                 160

Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe
                165                 170                 175

Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser
            180                 185                 190

His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
        195                 200                 205

Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
    210                 215                 220

Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser Gly Ala Gly Leu His Gly Thr Trp
225                 230                 235                 240
```

Pro Leu Leu Cys Ser Leu Ser Leu Val Leu Leu Trp Val Ile Ser
245 250 255

<210> 143
<211> 466
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 143
Thr Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His
1 5 10 15

His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Asn Leu His Asp Gln Cys Ser
20 25 30

Pro Trp Lys Thr Asn Ser Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala
35 40 45

His Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly
50 55 60

Thr Met Thr Ser Glu Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu
65 70 75 80

Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln
85 90 95

Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp
100 105 110

Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser
115 120 125

Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro
130 135 140

Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala
145 150 155 160

Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr
165 170 175

Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln
180 185 190

```
Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Val
        195                 200                 205

Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
```

435 440 445

Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
450 455 460

His Glu
465

<210> 144
<211> 257
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 144
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

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

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr Tyr Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 145
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 145
Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala
1 5 10 15

Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln
20 25 30

Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln
35 40 45

Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His
50 55 60

Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr
65 70 75 80

Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val
85 90 95

Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys
100 105 110

Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys
115 120 125

```
Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys
    130                 135                 140

Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr
145                 150                 155                 160

Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr Tyr Ser Tyr Lys Val Ser
                165                 170                 175

Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro
            180                 185                 190

Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala
        195                 200                 205

Met Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
```

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
450 455 460

Glu Trp His Glu
465

<210> 146
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146
Met Val Trp Lys Trp Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Val Cys Val Ala
1 5 10 15

Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
20 25 30

Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
35 40 45

Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
50 55 60

Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
65 70 75 80

Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
85 90 95

Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
100 105 110

Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
115 120 125

Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
130 135 140

Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
165 170 175

Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
180 185 190

Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
195 200 205

Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
210 215 220

Ala Ala Met His Val Asn Ala Gly Glu Met Leu His Gly Thr Gly Gly
225 230 235 240

Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Gln Leu Trp Leu Leu Gly
245 250 255

<210> 147
<211> 472
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 147
Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
1 5 10 15

Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
20 25 30

Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
35 40 45

Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
50 55 60

Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
65 70 75 80

```
Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
                85                  90                  95

Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
            100                 105                 110

Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
        115                 120                 125

Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
    130                 135                 140

Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
145                 150                 155                 160

Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
                165                 170                 175

Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
            180                 185                 190

Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
        195                 200                 205

Ala Ala Met His Val Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
```

325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
450 455 460

Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465 470

<210> 148
<211> 243
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148
Met Ala Trp Gln Met Met Gln Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ala Gln Pro Arg Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp Leu Leu
20 25 30

Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Thr Gln Pro Ser Pro Glu
35 40 45

Asp Glu Leu Tyr Gly Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys
50 55 60

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

```
Asn Phe Asn Trp Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys Lys Arg
                85                  90                  95

His Phe Ile Gln Asp Ser Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly
            100                 105                 110

Pro Trp Ile Arg Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu
        115                 120                 125

Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys
    130                 135                 140

Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
145                 150                 155                 160

Thr Ser Gly Ile Asn Glu Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser Thr Phe
                165                 170                 175

Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser
            180                 185                 190

His Ser Phe Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
        195                 200                 205

Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
    210                 215                 220

Lys Phe Tyr Ala Ala Ala Met Asn Ala Gly Ala Pro Ser Arg Gly Ile
225                 230                 235                 240

Ile Asp Ser
```

<210> 149
<211> 479
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 149

```
Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
1               5                   10                  15

His His Lys Thr Gln Pro Ser Pro Glu Asp Glu Leu Tyr Gly Gln Cys
            20                  25                  30
```

```
Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu
        35                  40                  45

Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys
    50                  55                  60

Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Ser Cys
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Arg Gln Val Asn
                85                  90                  95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
            100                 105                 110

Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
        115                 120                 125

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Ile Asn Glu Cys
    130                 135                 140

Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro
145                 150                 155                 160

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Phe Lys Val Ser Asn
                165                 170                 175

Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala
            180                 185                 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Lys Phe Tyr Ala Ala Ala Met
        195                 200                 205

Asn Ala Gly Ala Pro Ser Arg Gly Ile Ile Asp Ser Val Asp Glu Gln
    210                 215                 220

Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr
225                 230                 235                 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
                245                 250                 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            260                 265                 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
```

275 280 285

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly
450 455 460

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465 470 475

<210> 150
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 151
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 151
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacgctggtg ttactccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 152
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 152
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacatcggtg ttgttacttt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 153
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 153
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacactggtg gttcttctgc tttcgactat tggggtcaag gcaccctcgt aacggtttct 360

tct 363

<210> 154
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<220>
<221> base_modificada
<222> (47)..(47)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 154
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgnttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgaa 300

tggcgtcgtt acacttcttt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 155
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 155
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtggt 300

tggatccgtt gggaacattt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 156
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 156
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacctgttct ctacttcttt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 157
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 157
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgag gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacatcggta tcgttccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 158
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 158
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 159
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
<221> base_modificada
<222> (53)..(53)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 159
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc ccngcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaacc gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttactt cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 160
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 160
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacgttggtg tttctccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 161
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
<221> base_modificada
<222> (47)..(47)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<220>
<221> base_modificada
<222> (177)..(177)
<223> a, c, t, g, desconocida u otra

<400> 161
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgnttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcntac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaacttc 300

actgttctgc gtgttccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 162
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 162
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat gggcttggtt cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 163
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 163
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaacc gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccttgggaat gggcttactt cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 164
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 164
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcactggt 300

tggtctcgtt ggggttacat ggactattgg ggccaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 165
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 165
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgaa 300

tggatccgtt actaccattt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 166
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 166

caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcgttggt 300

tggtaccgtt ggggttacat ggactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 167
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 167
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtaaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagctgtt 300

ttctaccgtg cttggtactc tttcgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

tca 363

<210> 168
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 168
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataccagcc caccaccaac gtttggccag 300

ggcaccaaag tcgagatcaa g 321

<210> 169
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 169
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccatgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctctttc 300

ttcactggtt tccatctgga ctattggggt caaggcaccc tcgtaacggt ttcttct 357

<210> 170
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 170
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatacca acgaacatta ttatacgttc 300

ggccagggga ccaaagtgga aatcaaa 327

<210> 177
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 177
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctcttac 300

atcgacatgg actattgggg tcaaggcacc ctcgtaacgg tttcttct 348

<210> 178
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 178
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggataact ggagcccaac gttcggccag 300

gggaccaaag tggaaatcaa a 321

<210> 179
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 179
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctcttac 300

gttgacatgg actattgggg tcaaggcacc ctcgtaacgg tttcttct 348

<210> 180
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 180
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctacc tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggatattt ggagcccaac gttcggccag 300

gggaccaaag tggaaatcaa a 321

<210> 181
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 181
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagactct 300

tcttacgttg aatggtacgc tttcgactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360

agt 363

<210> 182
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 182
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gactccactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagccaacca gcagcccaat tacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 183
<211> 684
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 183
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagcgctag taccaagggc cccagcgtgt tccccctggc acccagcagc 420

aagagcacat ctggcggaac agccgctctg ggctgtctgg tgaaagacta cttccccgag 480

cccgtgaccg tgtcttggaa ctctggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctttccagcc 540

gtgctgcaga gcagcggcct gtactccctg tcctccgtgg tcaccgtgcc ctctagctcc 600

ctgggaacac agacatatat ctgtaatgtc aatcacaagc cttccaacac caaagtcgat 660

aagaaagtcg agcccaagag ctgc 684

<210> 184
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 184
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagcgctag tgtggccgct ccctccgtgt ttatctttcc cccatccgat 420

gaacagctga aaagcggcac cgcctccgtc gtgtgtctgc tgaacaattt ttaccctagg 480

gaagctaaag tgcagtggaa agtggataac gcactgcagt ccggcaactc ccaggaatct 540

gtgacagaac aggactccaa ggacagcacc tactccctgt cctccaccct gacactgtct 600

aaggctgatt atgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgt 696

<210> 185
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Primer
sintético"

<400> 185
gcaggcaagc attatgcagc ggacttttgg tcaagg 36

<210> 186
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Primer
sintético"

<400> 186
caggcaagca ttatgagccg gacttttggt caagg 35

<210> 187
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Primer
sintético"

<400> 187
cattatgaac cgggcttttg gtcaaggcac caaggtc 37

<210> 188
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Primer
sintético"

<400> 188
cattatgaac cggaattttg gtcaaggcac caaggtc 37

<210> 189
<211> 2067
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 189
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 190
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 190
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 191
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 191
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caacccaagg ctgcccccag cgtgaccctg 360

ttcccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 192
<211> 2067
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 192
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag cacaaagggc cctagcgtgt tccctctggc ccccagcagc 420

aagagcacaa gcggcggaac agccgccctg ggctgcctcg tgaaggacta cttccccgag 480

cccgtgacag tgtcttggaa cagcggagcc ctgacaagcg gcgtgcacac cttccctgcc 540

gtgctgcaga gcagcggcct gtactccctg agcagcgtgg tcaccgtgcc tagcagcagc 600

ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac 660

aagaaggtgg agcccaagag ctgtgatggc ggaggagggt ccggaggcgg aggatccgag 720

gtgcaattgg ttgaatctgg tggtggtctg gtaaaaccgg gcggttccct gcgtctgagc 780

tgcgcggctt ccggattcac cttctccaac gcgtggatga gctgggttcg ccaggccccg 840

ggcaaaggcc tcgagtgggt tggtcgtatc aagtctaaaa ctgacggtgg caccacggat 900

tacgcggctc cagttaaagg tcgttttacc atttcccgcg acgatagcaa aaacactctg 960

tatctgcaga tgaactctct gaaaactgaa gacaccgcag tctactactg tactaccccg 1020

tgggaatggt cttggtacga ttattggggc cagggcacgc tggttacggt gtctagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 193
<211> 1365
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 193
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 720

gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccccaa aacccaagga caccctcatg 780

atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc 1020

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080

ccatgccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc 1140

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa 1365

<210> 194
<211> 681
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 194
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgcttcac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 200
<211> 2067
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 200
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300
ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360
gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420
ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480
tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660
aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720
tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780
ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840
tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900
aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960
agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcgcc 1020
agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080
agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140
acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200
aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260
ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320
atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380
agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800
accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 201
<211> 2067
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 201
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

gcctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 202
<211> 1323
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 202
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgctagca ccaagggccc atcggtcttc 360

cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 420

aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc 480

gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg 540

accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 660

ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 720

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 780

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat 840

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 900

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 960

gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1020

caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 1080

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1140

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1200

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1260

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1320

aaa 1323

<210> 203
<211> 681
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 203
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcgtgg ccgctccctc cgtgttcatc ttcccacctt ccgacgagca gctgaagtcc 420

ggcaccgctt ctgtcgtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag 480

tggaaggtgg acaacgccct gcagtccggc aacagccagg aatccgtgac cgagcaggac 540

tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc accctgaccc tgtccaaggc cgactacgag 600

aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc caccagggcc tgtctagccc cgtgaccaag 660

tctttcaacc ggggcgagtg c 681

<210> 204
<211> 693
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 204
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggagga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt caccttctcc acctacgcca tgaactgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtgtcccgg atcagatcca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg actccgtgaa gggccggttc accatctctc gggacgactc caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaactc cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaactc ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag ccccaaggct gcccccagcg tgaccctgtt tccccccagc 420

agcgaggaac tgcaggccaa caaggccacc ctggtctgcc tgatcagcga cttctaccca 480

ggcgccgtga ccgtggcctg gaaggccgac agcagccccg tgaaggccgg cgtggagacc 540

accacccca gcaagcagag caacaacaag tacgccgcca gcagctacct gagcctgacc 600

cccgagcagt ggaagagcca caggtcctac agctgccagg tgacccacga gggcagcacc 660

gtggagaaaa ccgtggcccc caccgagtgc agc 693

<210> 205
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 205
cagaccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcagcag 120

aagccaggcc aggctcccag aggactgatc ggcggcacca acgccagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgtg 240

cagcctgaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtccta 327

<210> 206
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 206
cagaccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcagcag 120

aagccaggcc aggctcccag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgtg 240

cagcctgaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acgccaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtccta 327

<210> 207
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 207
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt ggtcttggta cgactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360

gctagc 366

<210> 208
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 208
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgtcccgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt ggtcttggta cgactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360

gctagc 366

<210> 209
<211> 366

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 209
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggatct atcaagagca agaccgacgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt ggtcttggta cgactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360

gctagc 366

<210> 210
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 210
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagc 366

<210> 211
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 211
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt actcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagc 366

<210> 212
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 212
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

actatcgttg tttctccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

gctagc 366

<210> 213
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 213
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

ttcatcggtt ctgttgctat ggactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

gctagc 366

<210> 214
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 214
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtctg 300

acttactcta tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagc 357

<210> 215
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 215
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcact gcagattcca 300

aacacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaacgta cg 342

<210> 216
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 216
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatacgct 300

tacgctctgg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagc 354

<210> 217
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 217
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagcatggca gcagcagcac gttcggccag 300

gggaccaaag tggaaatcaa acgtacg 327

<210> 218
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 218
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttctctgctg gtcgtctgat ggactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

gctagc 366

<210> 219
<211> 345

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 219
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcact gcagacccca 300

ccaattacct ttggtcaagg caccaaggtc gaaattaaac gtacg 345

<210> 220
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 220
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tacaacgctt tcgactattg gggtcacggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagc 357

<210> 221
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 221
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcatg gcatagccca 300

acttttggtc aaggcaccaa ggtcgaaatt aaacgtacg 339

<210> 222
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 222
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgct 300

acttacacta tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagc 357

<210> 223
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 223
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcact gcagacccca 300

attacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaacgta cg 342

<210> 224
<211> 1344
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido

sintético"

<400> 224
caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaagatc 60

agctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc ggctacttca tgaactgggt caagcagagc 120

cacggcaaga gcctggaatg gatcggcaga atccacccct acgacggcga caccttctac 180

aaccagaact tcaaggacaa ggccaccctg accgtggaca agagcagcaa caccgcccac 240

atggaactgc tgagcctgac cagcgaggac ttcgccgtgt actactgcac cagatacgac 300

ggcagccggg ccatggatta ttggggccag ggcaccaccg tgacagtgtc cagcgctagc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccccctggcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420

gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag ttctggcctg 540

tatagcctga gcagcgtggt caccgtgcct tctagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaggtgga gcccaagagc 660

tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 225
<211> 2073
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 225
caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaagatc 60

```
agctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc ggctacttca tgaactgggt caagcagagc      120
cacggcaaga gcctggaatg gatcggcaga atccacccct acgacggcga caccttctac      180
aaccagaact tcaaggacaa ggccaccctg accgtggaca agagcagcaa caccgcccac      240
atggaactgc tgagcctgac cagcgaggac ttcgccgtgt actactgcac cagatacgac      300
ggcagccggg ccatggatta ttggggccag ggcaccaccg tgacagtgtc cagcgctagc      360
acaaagggcc ccagcgtgtt ccctctggcc cctagcagca agagcacatc tggcggaaca      420
gccgccctgg gctgcctcgt gaaggactac tttcccgagc ctgtgaccgt gtcctggaac      480
tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg      540
tactctctga gcagcgtggt caccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc      600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaagtggaca agaaggtgga gcccaagagc      660
tgtgatggcg gaggagggtc cggaggcgga ggatccgaag tgcagctggt ggaaagcggc      720
ggaggcctgg tgcagcctaa gggctctctg aagctgagct gtgccgccag cggcttcacc      780
ttcaacacct acgccatgaa ctgggtgcgc caggcccctg gcaaaggcct ggaatgggtg      840
gcccggatca gaagcaagta caacaattac gccacctact acgccgacag cgtgaaggac      900
cggttcacca tcagccggga cgacagccag agcatcctgt acctgcagat gaacaacctg      960
aaaaccgagg acaccgccat gtactactgc gtgcggcacg gcaacttcgg caacagctat     1020
gtgtcttggt ttgcctactg gggccagggc accctcgtga cagtgtctgc tgctagcgtg     1080
gccgctccct ccgtgtttat ctttccccca tccgatgaac agctgaaaag cggcaccgcc     1140
tccgtcgtgt gtctgctgaa caatttttac cctagggaag ctaaagtgca gtggaaagtg     1200
gataacgcac tgcagtccgg caactcccag gaatctgtga cagaacagga ctccaaggac     1260
agcacctact ccctgtcctc caccctgaca ctgtctaagg ctgattatga gaaacacaaa     1320
gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac     1380
aggggagagt gtgacaagac ccacacctgt ccccccttgtc ctgcccctga agctgctggc     1440
ggcccttctg tgttcctgtt ccccccaaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc     1500
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat     1560
tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac     1620
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc     1680
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc     1740
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atgccgggat     1800
gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac     1860
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc     1920
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1980
```

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 2040

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 2073

<210> 226
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 226
gacatcgagc tgacccagag ccctgcctct ctggccgtgt ctctgggaca gagagccatc 60

atcagctgca aggccagcca gagcgtgtcc tttgccggca cctctctgat gcactggtat 120

caccagaagc ccggccagca gcccaagctg ctgatctaca gagccagcaa cctggaagcc 180

ggcgtgccca caagattttc cggcagcggc agcaagaccg acttcaccct gaacatccac 240

cccgtggaag aagaggacgc cgccacctac tactgccagc agagcagaga gtacccctac 300

accttcggcg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 227
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 227
Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala
1 5 10 15

Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln
20 25 30

Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln
35 40 45

Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His
50 55 60

Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr

65 70 75 80

Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val
85 90 95

Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys
100 105 110

Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys
115 120 125

Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys
130 135 140

Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr
145 150 155 160

Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser
165 170 175

Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro
180 185 190

Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala
195 200 205

Met

<210> 228
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 228
Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
1 5 10 15

Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
20 25 30

Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
35 40 45

Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
50 55 60

Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
65 70 75 80

```
Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
                85                  90                  95

Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
            100                 105                 110

Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
        115                 120                 125

Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
    130                 135                 140

Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
145                 150                 155                 160

Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
                165                 170                 175

Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
            180                 185                 190

Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
        195                 200                 205

Ala Ala Met His Val Asn
    210
```

<210> 229
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 229

```
Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
1               5                   10                  15

His His Lys Thr Gln Pro Ser Pro Glu Asp Glu Leu Tyr Gly Gln Cys
            20                  25                  30

Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu
        35                  40                  45

Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys
    50                  55                  60

Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Ser Cys
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Arg Gln Val Asn
                85                  90                  95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
            100                 105                 110

Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
        115                 120                 125

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Ile Asn Glu Cys
    130                 135                 140

Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro
145                 150                 155                 160

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Phe Lys Val Ser Asn
                165                 170                 175

Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala
            180                 185                 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Lys Phe Tyr Ala Ala Ala Met
        195                 200                 205

Asn Ala Gly Ala Pro Ser Arg Gly Ile Ile Asp Ser
    210                 215                 220


<210> 230
<211> 208
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 230
Thr Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His
1               5                   10                  15

His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Asn Leu His Asp Gln Cys Ser
            20                  25                  30

Pro Trp Lys Thr Asn Ser Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala
        35                  40                  45

His Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly
    50                  55                  60

Thr Met Thr Ser Glu Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu
65                  70                  75                  80
```

Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln
85 90 95

Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp
100 105 110

Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser
115 120 125

Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro
130 135 140

Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala
145 150 155 160

Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr
165 170 175

Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln
180 185 190

Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser
195 200 205

<210> 231
<211> 213
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 231
Glu Ala Gln Thr Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val
1 5 10 15

Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys
20 25 30

Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr
35 40 45

Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe
50 55 60

Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe
65 70 75 80

Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp
85 90 95

Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val

100 105 110

Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr
115 120 125

Ser Tyr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly
130 135 140

Phe Asn Lys Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr
145 150 155 160

Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr Tyr Ser Tyr
165 170 175

Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp
180 185 190

Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr
195 200 205

Ala Ala Ala Met Ser
210

<210> 232
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 232
Pro Trp Glu Tyr Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 233
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 233
Asn Tyr Thr Ile Val Val Ser Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 234
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 234
Asn Tyr Phe Ile Gly Ser Val Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 235
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 235
Gly Leu Thr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5

<210> 236
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 236
Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Asn Thr
1 5

<210> 237
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 237
Tyr Ala Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 238
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 238
Gln Gln His Gly Ser Ser Ser Thr
1 5

<210> 239
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 239
Gly Asp Phe Ser Ala Gly Arg Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 240
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 240
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 241
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 241
Gly Asp Tyr Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 242
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido

sintético"

<400> 242
Met Gln Ala Trp His Ser Pro Thr
1 5

<210> 243
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 243
Gly Ala Thr Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 244
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Ile Thr
1 5

<210> 245
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 245
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 246
<211> 2076
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 246
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccatgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctctttc 300
ttcactggtt tccatctgga ctattggggt caaggcaccc tcgtaacggt ttcttctgct 360
agcacaaagg gccccagcgt gttccctctg gcccctagca gcaagagcac atctggcgga 420
acagccgccc tgggctgcct cgtgaaggac tactttcccg agcctgtgac cgtgtcctgg 480
aactctggcg ccctgacaag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtactctc tgagcagcgt ggtcaccgtg cctagcagca gcctgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaagtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
agctgtgatg gcggaggagg gtccggaggc ggaggatccg aggtgcagct gctggaatct 720
ggcggcggac tggtgcagcc tggcggatct ctgagactga gctgtgccgc cagcggcttc 780
accttcagca cctacgccat gaactgggtg cgccaggccc ctggcaaagg cctggaatgg 840
gtgtcccgga tcagaagcaa gtacaacaac tacgccacct actacgccga cagcgtgaag 900
ggccggttca ccatcagccg ggacgacagc aagaacaccc tgtacctgca gatgaacagc 960
ctgcgggccg aggacaccgc cgtgtactat tgtgtgcggc acggcaactt cggcaacagc 1020
tatgtgtctt ggtttgccta ctggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc aagcgctagt 1080
gtggccgctc cctccgtgtt tatctttccc ccatccgatg aacagctgaa aagcggcacc 1140
gcctccgtcg tgtgtctgct gaacaatttt taccctaggg aagctaaagt gcagtggaaa 1200
gtggataacg cactgcagtc cggcaactcc caggaatctg tgacagaaca ggactccaag 1260
gacagcacct actccctgtc ctccaccctg acactgtcta aggctgatta tgagaaacac 1320
aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc 1380
aacaggggag agtgtgacaa gacccacacc tgtccccctt gtcctgcccc tgaagctgct 1440
ggcggccctt ctgtgttcct gttcccccca aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg 1500
acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggat gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc 1560
aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aacgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 1620
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1680
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc 1740
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg 1800
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1860
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1920
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1980
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 2040
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 2076

<210> 247
<211> 1347
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 247
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccatgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctctttc 300

ttcactggtt tccatctgga ctattggggt caaggcaccc tcgtaacggt ttcttctgct 360

agcaccaagg gcccctccgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420

acagccgctc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagttctggc 540

ctgtatagcc tgagcagcgt ggtcaccgtg ccttctagca gcctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 248
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 248
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 249
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 249
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Gln Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala

50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 250
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 250
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Ala Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 251

<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 251
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ala Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 252
<211> 689
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 252
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
```

290 295 300

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

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

Asn Phe Gly Ala Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
370 375 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385 390 395 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
405 410 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
420 425 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
435 440 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
450 455 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465 470 475 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
485 490 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
500 505 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
515 520 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 253
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 253
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
```

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly Lys
    450
```

<210> 254
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 254

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
            20                  25                  30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
        35                  40                  45
```

```
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65                  70                  75                  80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85                  90                  95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
            100                 105                 110

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

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
                165                 170                 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
            180                 185                 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
        195                 200                 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
    210                 215


<210> 255
<211> 689
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
      sintético"

<400> 255
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

```
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Phe Gly Asn Ala Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
```

530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 259
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 259
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 260
<211> 690
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 260
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
245 250 255

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
260 265 270

```
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
        275                 280                 285

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

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

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
                325                 330                 335

Asn Ala Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            340                 345                 350

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
    370                 375                 380

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
385                 390                 395                 400

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
                405                 410                 415

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
            420                 425                 430

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
        435                 440                 445

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
    450                 455                 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
465                 470                 475                 480

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                485                 490                 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            500                 505                 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        515                 520                 525
```

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
530 535 540

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
545 550 555 560

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
565 570 575

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
580 585 590

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
595 600 605

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
610 615 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625 630 635 640

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
645 650 655

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
660 665 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
675 680 685

Gly Lys
690

<210> 261
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 261
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgaggg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 262
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 262
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactcaggg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 263
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 263
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcgccag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagc 375

<210> 264
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 264
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacgc ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagc 375

<210> 265
<211> 2067
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 265
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcgcc 1020

agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 266
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 266
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 267
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 267
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caacccaagg ctgccccag cgtgaccctg 360

ttccccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 268
<211> 2067
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 268
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

gcctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 274
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 274
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 275
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 275
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 276
<211> 689
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 276
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365
```

```
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                565                 570                 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            580                 585                 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        595                 600                 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    610                 615                 620
```

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 277
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 277
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
```

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 278
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 278
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Arg Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 279
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 279
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

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

Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 280
<211> 674
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 280
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Arg Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
                245                 250                 255

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
            260                 265                 270

Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
        275                 280                 285

Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
```

```
    290                 295                 300

Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
                325                 330                 335

Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
            340                 345                 350

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
        355                 360                 365

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
    370                 375                 380

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
385                 390                 395                 400

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
                405                 410                 415

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
            420                 425                 430

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
        435                 440                 445

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
    450                 455                 460

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
465                 470                 475                 480

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
                485                 490                 495

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            500                 505                 510

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
        515                 520                 525

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
    530                 535                 540
```

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
545 550 555 560

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
565 570 575

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
580 585 590

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
595 600 605

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
610 615 620

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
625 630 635 640

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
645 650 655

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665 670

Gly Lys

<210> 281
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 281
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Arg Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
```

```
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
        355                 360                 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

<210> 282
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 282

```
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1               5                   10                  15

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60
```

```
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65                  70                  75                  80

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

Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
            100                 105                 110

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

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
                165                 170                 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
            180                 185                 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
        195                 200                 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
    210                 215


<210> 283
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
       sintético"

<400> 283
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
```

```
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Asp Trp Ser Tyr Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115


<210> 284
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
       sintético"

<400> 284
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95

Arg Gln Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110


<210> 285
<211> 673
<212> PRT
```

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 285

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Asp Trp Ser Tyr Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro
225                 230                 235                 240

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
                245                 250                 255

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
            260                 265                 270

Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
        275                 280                 285

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

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

Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
                325                 330                 335

Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
            340                 345                 350

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
        355                 360                 365

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
    370                 375                 380

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
385                 390                 395                 400

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
                405                 410                 415

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
            420                 425                 430

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
        435                 440                 445

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
    450                 455                 460

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
465                 470                 475                 480
```

```
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                485                 490                 495

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
            500                 505                 510

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
        515                 520                 525

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
    530                 535                 540

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
545                 550                 555                 560

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                565                 570                 575

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
            580                 585                 590

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
        595                 600                 605

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
    610                 615                 620

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
625                 630                 635                 640

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                645                 650                 655

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            660                 665                 670

Lys
```

<210> 286
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 286
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1   5   10   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20   25   30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35   40   45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50   55   60

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

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

Ala Arg Gly Asp Trp Ser Tyr Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100   105   110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225   230   235   240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 287
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 287
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgaggg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

<210> 288
<211> 2067
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 288
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgaggg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 289
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 289
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgaggg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 290
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 290
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtggtgac 300

taccgttacc gttacttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 357

<210> 291
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 291
tcttctgaac tgactcaaga tccagctgtt agcgtggctc tgggtcagac tgtacgtatc 60

acctgccaag gcgattctct gcgctcctac tacgcaagct ggtaccagca gaaaccgggt 120

caggccccag ttctggtgat ttacggcaaa aacaaccgtc cgtctgggat cccggaccgt 180

ttctccggca gctcttccgg taacacggcg agcctcacca tcactggcgc tcaagcagaa 240

gacgaggccg actattactg taactctcgg gaaagcccac caaccggcct ggttgtcttc 300

ggtggcggta ccaagctgac cgtccta 327

<210> 292
<211> 2022
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 292
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtggtgac 300

taccgttacc gttacttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtgct 360

agcaccaagg gcccctccgt gtttcctctg gcccccttcca gcaagtccac ctctggcgga 420

actgccgctc tgggctgcct ggtggaagat tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aattctggcg ctctgacctc cggcgtgcac acctttccag ctgtgctgca gtcctccggc 540

ctgtactccc tgtcctccgt cgtgacagtg ccctccagct ctctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaaggtgg acgagaaggt ggaacccaag 660

tcctgcgacg gtggcggagg ttccggaggc ggaggatccc aggctgtcgt gacccaggaa 720

ccctccctga cagtgtctcc tggcggcacc gtgaccctga cctgtggatc ttctaccggc 780

gctgtgacca cctccaacta cgccaattgg gtgcaggaaa agcccggcca ggccttcaga 840

ggactgatcg gcggcaccaa caagagagcc cctggcaccc ctgccagatt ctccggttct 900

ctgctgggcg gcaaggctgc cctgactctg tctggtgctc agcctgagga cgaggccgag 960

tactactgcg ccctgtggta ctccaacctg tgggtgttcg gcggaggcac caagctgacc 1020

gtgctgtcca gcgcttccac caagggaccc agtgtgttcc ccctggcccc cagctccaag 1080

tctacatccg gtggcacagc tgccctggga tgtctcgtga aggactactt tcctgagcct 1140

gtgacagtgt cttggaacag cggagccctg accagcggag tgcacacatt ccctgcagtg 1200

ctgcagagca gcggcctgta tagcctgagc agcgtcgtga ccgtgccttc ctctagcctg 1260

ggaacacaga catatatctg taatgtgaat cataagccca gtaataccaa agtggataag 1320

aaagtggaac ctaagagctg cgataagacc cacacctgtc ccccctgccc tgctcctgaa 1380

gctgctggtg gccctagcgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1440

tcccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1500

aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag 1560

gaacagtaca actccaccta ccgggtggtg tccgtgctga cagtgctgca ccaggactgg 1620

ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg tccaacaagg ccctgggcgc tcccatcgaa 1680

aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc cgggaacccc aggtgtacac cctgccccca 1740

tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat 1800

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1860

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1920

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1980

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 2022

<210> 293
<211> 1347
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 293
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtggtgac 300

taccgttacc gttacttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtgct 360

agcaccaagg gcccctccgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420

acagccgctc tgggctgcct ggtcgaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagttctggc 540

ctgtatagcc tgagcagcgt ggtcaccgtg ccttctagca gcctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acgagaaggt ggagcccaag 660

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 294
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 294
tcttctgaac tgactcaaga tccagctgtt agcgtggctc tgggtcagac tgtacgtatc 60

acctgccaag gcgattctct gcgctcctac tacgcaagct ggtaccagca gaaaccgggt 120

caggccccag ttctggtgat ttacggcaaa aacaaccgtc cgtctgggat cccggaccgt 180

ttctccggca gctcttccgg taacacggcg agcctcacca tcactggcgc tcaagcagaa 240

gacgaggccg actattactg taactctcgg gaaagcccac caaccggcct ggttgtcttc 300

ggtggcggta ccaagctgac cgtcctaggt caacccaagg ctgcccccag cgtgaccctg 360

ttccccccca gcagcaagaa actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 295
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 295
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tggtcttact acatggacta ttggggtcaa ggcaccctcg taacggtttc ttct 354

<210> 296
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 296
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcacg gcagacccca 300

acttttggtc aaggcaccaa ggtcgaaatt aaa 333

<210> 297
<211> 2019
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 297
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tggtcttact acatggacta ttggggtcaa ggcaccctcg taacggtttc ttctgctagc 360

accaagggcc cctccgtgtt tcctctggcc ccttccagca agtccacctc tggcggaact 420

gccgctctgg gctgcctggt ggaagattac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaat 480

tctggcgctc tgacctccgg cgtgcacacc tttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 540

tactccctgt cctccgtcgt gacagtgccc tccagctctc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggacg agaaggtgga acccaagtcc 660

tgcgacggtg gcggaggttc cggaggcgga ggatcccagg ctgtcgtgac ccaggaaccc 720

tccctgacag tgtctcctgg cggcaccgtg accctgacct gtggatcttc taccggcgct 780

gtgaccacct ccaactacgc caattgggtg caggaaaagc ccggccaggc cttcagagga 840

ctgatcggcg gcaccaacaa gagagcccct ggcacccctg ccagattctc cggttctctg 900

ctgggcggca aggctgccct gactctgtct ggtgctcagc ctgaggacga ggccgagtac 960

tactgcgccc tgtggtactc caacctgtgg gtgttcggcg gaggcaccaa gctgaccgtg 1020

ctgtccagcg cttccaccaa gggacccagt gtgttccccc tggcccccag ctccaagtct 1080

acatccggtg gcacagctgc cctgggatgt ctcgtgaagg actactttcc tgagcctgtg 1140

acagtgtctt ggaacagcgg agccctgacc agcggagtgc acacattccc tgcagtgctg 1200

cagagcagcg gcctgtatag cctgagcagc gtcgtgaccg tgccttcctc tagcctggga 1260

acacagacat atatctgtaa tgtgaatcat aagcccagta ataccaaagt ggataagaaa 1320

gtggaaccta agagctgcga taagacccac acctgtcccc cctgccctgc tcctgaagct 1380

gctggtggcc ctagcgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatctcc 1440

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag 1500

ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc tagagaggaa 1560

cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg 1620

aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgggcgctcc catcgaaaag 1680

accatctcca aggccaaggg ccagccccgg gaaccccagg tgtacaccct gccccccatgc 1740

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgtggtgcc tggtcaaagg cttctatccc 1800

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1860

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1920

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1980

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 2019

<210> 298
<211> 1344
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 298
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tggtcttact acatggacta ttggggtcaa ggcaccctcg taacggtttc ttctgctagc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccccctggcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420

gccgctctgg gctgcctggt cgaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag ttctggcctg 540

tatagcctga gcagcgtggt caccgtgcct tctagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggacg agaaggtgga gcccaagagc 660

tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 299
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 299
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcacg gcagacccca 300

acttttggtc aaggcaccaa ggtcgaaatt aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatcg gaagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 300
<211> 50
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(50)
<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 1-10 unidades de repetición
'Gly Gly Gly Gly Ser', en las que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Veáse la memoria descriptiva tal como se ha presentado para una
descripción detallada de
sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser
50

<210> 301
<211> 50
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(50)
<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 1-10 unidades de repetición
'Gly Gly Gly Gly Ser', en las que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Veáse la memoria descriptiva tal como se ha presentado para una
descripción detallada de
sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 301
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
35 40 45

Gly Gly
50

<210> 302
<211> 54
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(54)
<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 1-10 unidades de repetición
'Gly Gly Gly Gly Ser', en las que algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Veáse la memoria descriptiva tal como se ha presentado para una
descripción detallada de

sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 302
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50

<210> 303
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 303
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 304
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 304
Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 305
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 305
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 306
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Marcador penta-His sintético"

<400> 306
His His His His His
1 5

<210> 307
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 307
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
100

<210> 308
<211> 692
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido

sintético"

<400> 308
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1   5   10   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20   25   30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35   40   45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50   55   60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr His Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65   70   75   80

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

Ala Arg Ser Phe Phe Thr Gly Phe His Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100   105   110

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

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

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

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

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

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

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

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

```
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
            260                 265                 270

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
        275                 280                 285

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

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

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
                325                 330                 335

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            340                 345                 350

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
        355                 360                 365

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
    370                 375                 380

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
385                 390                 395                 400

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
                405                 410                 415

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
            420                 425                 430

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
        435                 440                 445

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
    450                 455                 460

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
465                 470                 475                 480

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                485                 490                 495
```

```
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            500                 505                 510

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        515                 520                 525

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
    530                 535                 540

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
545                 550                 555                 560

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
                565                 570                 575

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            580                 585                 590

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
        595                 600                 605

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    610                 615                 620

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
625                 630                 635                 640

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                645                 650                 655

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            660                 665                 670

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        675                 680                 685

Ser Pro Gly Lys
    690


<210> 309
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"
```

<400> 309

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr His Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Ser Phe Phe Thr Gly Phe His Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
```

```
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
        355                 360                 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

<210> 310
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (201)..(201)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 310
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1   5   10   15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20   25   30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65   70   75   80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asn Glu His
                85   90   95

Tyr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100   105   110

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

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

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Xaa Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195   200   205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210   215

<210> 311
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 311
Gly Thr Asn Ala Arg Ala Pro
1 5

<210> 312
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 312
Ala Leu Trp Tyr Ala Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 313
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 313
Asn Ala Trp Met His
1 5

<210> 314
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 314
Ser Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 315
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 315
Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 316
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 316
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Arg Gln Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

```
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```