MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE COMPRENDEN UN TRÍMERO DE LIGANDO DE LA FAMILIA DE TNF

RESUMEN – OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a nuevas moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprenden (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, caracterizadas por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo

Sector: Productos biológicos.

MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE COMPRENDEN UN TRÍMERO DE LIGANDO DE LA FAMILIA DE TNF

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a nuevas moléculas de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprenden (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro, en las que las moléculas se caracterizan por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo. La invención se refiere además a métodos para producir estas moléculas y a métodos para usar las mismas.

ANTECEDENTES

Los ligandos que interactúan con moléculas de la superfamilia de receptores de TNF (factor de necrosis tumoral) tienen papeles centrales en la organización y función del sistema inmunitario. Mientras que regulan las funciones normales, tales como las respuestas inmunitarias, la hematopoyesis y la morfogénesis, los ligandos de la familia de TNF (también llamados citocinas) tienen un papel en la tumorigénesis, el rechazo de trasplantes, choque séptico, la replicación viral, la resorción ósea, la artritis reumatoide y la diabetes (Aggarwal, 2003). La familia de ligandos de TNF comprende 18 genes que codifican 19 proteínas transmembrana de tipo II (es decir, extremo N-terminal intracelular y extremo C-terminal extracelular), caracterizadas por la presencia de un dominio C-terminal conservado acuñado como el "dominio de homología de TNF" (THD). Este dominio es responsable de la unión a receptor y por lo tanto es crítico para la actividad biológica de los miembros de la familia de ligandos de TNF. La identidad de secuencia entre miembros de la familia es de ~20–30 % (Bodmer, 2002). Los miembros de la familia de ligandos de TNF ejercen su función como trímeros autoensamblantes no covalentes (Banner et al., Cell 1993, 73, 431-445). Por lo tanto, los ligandos de la familia de TNF forman un trímero que es capaz de unirse y activar a los receptores correspondientes de la superfamilia de TNFR.

4-1BB (CD137), un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, se identificó por primera vez como una molécula cuya expresión se induce por la activación de células T (Kwon y Weissman, 1989). Estudios posteriores demostraron la expresión de 4-1BB en linfocitos T - y B (Snell et al., 2011; Zhang et al., 2010), células NK (Lin et al., 2008), células NKT (Kim et al., 2008), monocitos (Kienzle y von Kempis, 2000; Schwarz et al., 1995), neutrófilos (Heinisch et al., 2000), mastocitos (Nishimoto et al., 2005) y células dendríticas así como células de origen no hematopoyético, tales como células endoteliales y de músculo liso (Broll et al., 2001; Olofsson et al., 2008). La expresión de 4-1BB en diferentes tipos celulares puede inducirse principalmente mediante diversas señales estimuladoras, tales como activación de receptores de células T (TCR) o de receptores de células B, así como la señalización inducida a través de moléculas coestimuladoras o receptores de citocinas proinflamatorias (Diehl et al., 2002; von Kempis et al., 1997; Zhang et al., 2010).

La expresión del ligando 4-1BB (4-1BBL o CD137L) está más restringida y se observa en células presentadoras de antígenos (APC) profesionales, tales como células B, células dendríticas (CD) y macrófagos. La expresión inducible de 4-1BBL es característica de las células T, incluyendo los subconjuntos de células T y células endoteliales (revisado en Shao y Schwarz, 2011).

Se sabe que la señalización de CD137 estimula la secreción de IFN y la proliferación de células NK (Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998) al igual que promueve la activación de las CD, según se indica por su supervivencia aumentada y la capacidad para secretar citocinas y regular positivamente moléculas coestimuladoras (Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002). Sin embargo, CD137 se caracteriza mejor como molécula coestimuladora que modula la activación inducida por TCR en los subconjuntos CD4+ y CD8+ de células T. En combinación con la activación de células T, los anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB potencian la proliferación de células B, estimulan la secreción de linfocinas y disminuyen la sensibilidad de los linfocitos T a la muerte de células inducida por activación (revisado en Snell et al., 2011).

En línea con estos dos efectos coestimuladores de los anticuerpos de 4-1BB en células T *in vitro*, su administración a ratones portadores de tumores da lugar a potentes efectos anti-tumorales en muchos modelos de tumor experimentales (Melero et al., 1997; Narazaki et al., 2010). Sin embargo, 4-1BB muestra normalmente su potencia como agente anti-tumoral solo cuando se administra en combinación con otros compuestos inmunomoduladores (Curran et al., 2011; Guo et

al., 2013; Morales-Kastresana et al., 2013; Teng et al., 2009; Wei et al., 2013), reactivos quimioterapéuticos (Ju et al., 2008; Kim et al., 2009), vacunación específica de tumor (Cuadros et al., 2005; Lee et al., 2011) o radioterapia (Shi y Siemann, 2006). Los experimentos de empobrecimiento *in vivo*demostraron que las células T CD8+ desempeñan el papel más crítico en el efecto antitumoral de los anticuerpos específicos de 4-1BB. Sin embargo, dependiendo del modelo de tumor o de la terapia combinada, que incluye anti-4-1BB, se han comunicado contribuciones de otros tipos de células, tales como CD, células NK o células T CD4+ (Melero et al., 1997; Murillo et al., 2009; Narazaki et al., 2010; Stagg et al., 2011).

Además de sus efectos en distintos subconjuntos de linfocitos, los agonistas de 4-1BB también pueden inducir la infiltración y la retención de células T activadas en el tumor mediante la regulación positiva mediada por 4-1BB de la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM1) y la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM1) en el endotelio vascular tumoral (Palazon et al., 2011).

La activación de 4-1BB también puede revertir el estado de anergia de células T inducido por la exposición a antígeno soluble, lo que puede contribuir a la eliminación de la tolerancia inmunológica en el microambiente tumoral o durante infecciones crónicas (Wilcox et al., 2004).

Parece ser que las propiedades inmunomoduladoras de los anticuerpos agonistas de 4-1BB *in vivo*requieren de la presencia de la parte Fc de tipo silvestre en la molécula de anticuerpo, implicando de este modo a la unión a receptor de Fc como un evento importante necesario para la actividad farmacológica de dichos reactivos, tal como se ha descrito para anticuerpos agonistas específicos para otros miembros inductores de la apoptosis o inmunomoduladores de la superfamilia de TNFR (Li y Ravetch, 2011; Teng et al., 2009). Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos agonistas específicos de 4-1BB con el dominio Fc funcionalmente activo también induce la expansión de células T CD8+ asociada con la toxicidad hepática (Dubrot et al., 2010) que disminuye o mejora significativamente en ausencia de receptores de Fc funcionales en ratones. En ensayos clínicos en seres humanos (ClinicalTrials.gov, NCT00309023), los anticuerpos agonistas de 4-1BB competentes de Fc (MBS-663513) administrados una vez cada tres semanas durante 12 semanas inducen la estabilización de la enfermedad en pacientes con melanoma, carcinoma ovárico o de células renales. Sin embargo, el mismo anticuerpo administrado en otro ensayo (NCT00612664) ocasionó hepatitis de grado 4, lo que condujo a la finalización del ensayo (Simeone y Ascierto, 2012).

De manera colectiva, los datos preclínicos y clínicos disponibles demuestran

claramente que hay una gran necesidad clínica de agonistas eficaces de 4-1BB. Sin embargo, los candidatos a fármaco de nueva generación no solo deben acoplarse eficazmente a 4-1BB en la superficie de células hematopoyéticas y endoteliales, sino también ser capaces de lograr que mediante mecanismos distintos de la unión a receptores de Fc para evitar efectos secundarios incontrolables. Esto último se ha logrado mediante la unión preferencial a y la oligomerización en restos específicos de tumores o asociados a tumores.

Se han producido proteínas de fusión compuestas de un dominio extracelular de un ligando de 4-1BB y un fragmento de anticuerpo monocatenario (Mueller et al., 2008; Hornig et al., 2012) o un solo ligando de 4-1BB fusionado al extremo C-terminal de una cadena pesada (Zhang et al, 2007). El documento WO 2010/010051 divulga la generación de proteínas de fusión que consisten en tres ectodominios de ligando de TNF unidos entre sí y fusionados a una parte de anticuerpo.

Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de nuevas moléculas de unión a antígeno que combinen un resto capaz de unirse preferentemente a dianas específicas de tumores o asociadas a tumores con un resto capaz de formar un trímero ligando de TNF coestimulador y que tenga la estabilidad suficiente como para que sea farmacéuticamente útil. Las moléculas de unión a antígeno de la presente invención comprenden ambas, y sorprendentemente proporcionan un ligando de TNF trimérico, y por lo tanto biológicamente activo, aunque uno de los ectodominios de ligando de TNF que trimerizan esté situado en otro polipéptido distinto al de los otros dos ectodominios de ligando de TNF de la molécula.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y
(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse establemente.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

(i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o
(ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 por un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un

enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

(iii) el primer polipéptido contiene un dominio de VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio de VL-CH1 o un dominio de VH-CL, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y a una VH o VL mediante un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento de los mismos conectado a través de un enlazador peptídico a la VL o VH de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, el miembro de la familia de ligandos de TNF es uno que coestimula la activación de células T humanas. Por lo tanto, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en la que el miembro de la familia de ligandos de TNF coestimula la activación de células T humanas. Más en particular, el miembro de la familia de ligando de TNF se selecciona entre 4-1BBL y OX40L.

En un aspecto, el miembro de la familia de ligando de TNF es 4-1BBL.

En un aspecto adicional, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 373, SEC ID Nº: 374 y SEC ID Nº: 375, en particular la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 1 o SEC ID Nº: 96.

En otro aspecto, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada

entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4 y SEC ID Nº: 96, en particular la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 1 o SEC ID Nº: 96. Más en particular, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 96.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 97, SEC ID Nº: 98 y SEC ID Nº: 99 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 3 y SEC ID Nº: 4.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 6.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 183.

En otro aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana

y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 97 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 184 o SEC ID Nº: 185.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene el trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que se conectan entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado mediante un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,

y en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que se conectan entre sí y al dominio CH1 mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado mediante un enlazador peptídico al dominio CL de dicho polipéptido.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,
(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CH1, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que se conectan entre sí y al dominio CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado mediante un enlazador peptídico al dominio CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una proteína de unión a antígeno de armazón.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es un fragmento de anticuerpo.

En particular, el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo, una molécula Fab, una molécula Fab sobrecruzada, una molécula Fab monocatenaria, una molécula Fv, una molécula scFv, un anticuerpo de un solo dominio, una VH y una proteína de unión a antígeno de armazón.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una proteína de unión a antígeno de armazón.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de familia de TNF tal como se ha descrito

anteriormente, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

La invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana. En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene el trímero de ligando de la familia de TNF comprende un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, en la que el antígeno de célula diana se selecciona entre el grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario (CEA), proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD19, CD20 y CD33.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención, en la que un péptido que un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CH1 o CL de una cadena pesada mediante un segundo enlazador peptídico y en la que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CL o CH1 en una cadena ligera mediante un tercer enlazador peptídico.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente, en la que el enlazador peptídico es $(G4S)_2$, es decir, un enlazador peptídico de SEC ID Nº: 13. En un aspecto, el primer enlazador peptídico es $(G4S)_2$, el segundo enlazador peptídico es GSPGSSSSGS (SEC ID Nº: 57) y el tercer enlazador peptídico es $(G4S)_2$. En otro aspecto, el primer, el segundo y el tercer enlazador peptídico es $(G4S)_2$.

La invención se refiere además a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, que comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de manera estable.

En particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención que comprende (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse de manera estable comprende además (a) una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, en la que la cadena pesada de Fab está fusionada en el extremo C-terminal al extremo N-terminal de un dominio CH2 en el dominio Fc.

En un aspecto adicional, el dominio Fc es una IgG, particularmente un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. Más en particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, que comprende (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociarse de manera estable, en la que el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc, en particular hacia un receptor Fcγ.

En particular, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de IgG. Más en particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención que comprende un dominio Fc de IgG1 con las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración EU).

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, un primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí por un primer enlazador peptídico fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo

enlazador peptídico a una segunda cadena pesada o ligera, y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el primer polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligando de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CL que es parte de una cadena ligera.

En otro aspecto más, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el primer polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligando de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CL que es parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena ligera.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el primer polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligando de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio VH que es parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio VL que es parte de una cadena ligera.

Se proporciona además una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que en el dominio CL adyacente al miembro de

la familia de ligandos de TNF, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K), y en la que en el dominio CH1 adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la que la molécula de unión a antígeno comprende

(a) una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,
(b) una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 97, SEC ID Nº: 98 y SEC ID Nº: 99, y
una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 3 y SEC ID Nº: 4.

En otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 por un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido.

En particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

En otro aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a

antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la que el antígeno de célula diana es CD19.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende un dominio VH que comprende (i) la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 195 o SEC ID Nº: 252, (ii) la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N: 196 o SEC ID Nº: 253, y (iii) la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 197 o SEC ID Nº: 254, y un dominio VL que comprende (iv) la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 198 o SEC ID Nº: 249, (v) la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 199 o SEC ID Nº: 250, y (vi) la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 200 o SEC ID Nº: 251.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202 o en la que el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202 o
una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358,
(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 108, SEC ID Nº: 111 y SEC ID Nº: 113, y

(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 109, SEC ID Nº: 110, SEC ID Nº: 112 y SEC ID Nº: 114.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202 o
una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358,
(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 115, SEC ID Nº: 117, SEC ID Nº: 119 y SEC ID Nº: 173, y
(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 116, SEC ID Nº: 118, SEC ID Nº: 120 y SEC ID Nº: 174.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende dos restos capaces de unirse específicamente a CD19. En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 29, 30 y 32 a 34, en la que la molécula de unión a antígeno comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 209, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 210, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, o
(ii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 213, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 214, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, o
(iii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 310, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 279, o

(iv) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 313, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 314, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 279.

En otro aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la que el antígeno de célula diana es CEA.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el resto capaz de unirse específicamente a CEA comprende un dominio VH que comprende (i) la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 321, (ii) la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 322, y (iii) la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 323, y un dominio VL que comprende (iv) la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 324, (v) la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 325, y (vi) la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 326.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el resto capaz de unirse específicamente a CEA comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la que la molécula de unión a antígeno comprende (i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330,
(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 108, SEC ID Nº: 111 y SEC ID Nº: 113, y
(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 109, SEC ID Nº: 110, SEC ID Nº: 112 y SEC ID Nº: 114.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330,
(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 115, SEC ID Nº: 117, SEC ID Nº: 119 y SEC ID Nº: 173, y
(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 116, SEC ID Nº: 118, SEC ID Nº: 120 y SEC ID Nº: 174.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende dos restos capaces de unirse específicamente a CEA. En particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 337, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 338, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334, o
(ii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 341, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 342, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la que el miembro de la familia de ligando de TNF es OX40L. En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 53 o SEC ID Nº: 54, en particular la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 53.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que

contiene trímero de ligando de la familia de TNF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 10 a 24, 29, 30, 32 a 34, 38 a 40, 44 y 45, que comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 371 o SEC ID Nº: 372 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 53 o SEC ID Nº: 54.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La invención proporciona además un vector, particularmente un vector de expresión, que comprende al polinucleótido aislado de la invención y una célula hospedadora que comprende al polinucleótido aislado o al vector de la invención. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula eucariota, en particular una célula de mamífero.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, que comprende las etapas de (i) cultivar a la célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno, y (ii) recuperar la molécula de unión a antígeno. La invención también abarca una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF producida mediante el método de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se encuentra abarcada por la invención la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento. En un aspecto, se proporciona la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo

necesite. En una realización específica, se proporciona la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los componentes para el ensamblaje de los ligandos de 4-1BB humanos triméricos separados. La figura (1A) muestra al ligando dimérico que se fusiona en el extremo C-terminal a un dominio CH1 o CL o a un dominio VL o VH humano y la figura (1B) muestra al ligando monomérico fusionado al dominio CL o CH1 o a un dominio VL o VH humano. La figura (1C) muestra al ligando dimérico que está fusionado en el extremo N-terminal a un dominio CH3 humano y la figura (1D) muestra al ligando monomérico fusionado en el extremo N-terminal a un dominio CH3 humano.

La figura 2 muestra las construcciones de moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de 4-1BBL 1.1 a 1.10 de la invención. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 1. Los dominios VH y VL son aquellos del anticuerpo anti-FAP, 28H1, el punto negro grueso representa la modificación de pomos en agujeros. * simboliza modificaciones de aminoácidos en el dominio CH1 y CL (los denominados restos cargados).

La figura 3 muestra los componentes para el ensamblaje de los ligandos de 4-1BB murinos triméricos separados. La figura (3A) muestra al ligando dimérico que está fusionado en el extremo C-terminal al dominio CL murino y la figura (3B) muestra al ligando monomérico fusionado en el extremo C-terminal al dominio CH1 murino. Componentes para el ensamblaje del ligando de 4-1BB murino trimérico separado. La figura (3C) muestra las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de 4-1BBL murino ensambladas tal como se describe en más detalle en el ejemplo 1.3.

La figura 4 muestra las construcciones de moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de 4-1BBL 2.1 a 2.6 de la invención. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 2. Los dominios VH y VL son aquellos del anticuerpo anti-FAP, 4B9, el punto negro grueso representa la modificación de pomos en agujeros. * simboliza modificaciones de aminoácidos en el dominio CH1 y CL (los denominados restos cargados).

La figura 5A y **la figura 5B** muestran las variantes “no dirigidas” de las construcciones 1.1 y 1.2 que comprenden una molécula Fab de DP47 en lugar de la

molécula Fab anti-FAP. Las moléculas se denominan Control A y Control B, respectivamente. La preparación se describe en el ejemplo 1.4. **La figura 5C** es un dibujo de la construcción 4-1BB Fc(kih) tal como se prepara en el ejemplo 3.

La figura 6 se refiere a la unión una molécula de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigido a FAP (trímero de 4-1BBL separado para FAP, círculos sólidos) o de molécula de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contiene trímero 4-1BB no dirigido a DP-47 (trímero 4-1BBL separado de DP-47, círculos huecos) a PBMC humanos en reposo (no expuestos previamente) o activados. Específicamente, la unión a células T CD8+ humanas en reposo (no expuestas previamente) o activadas se muestra en la figura (6A), a células T CD4+ humanas en reposo (no expuestas previamente) o activadas en la figura (6B) y a células NK humanas en reposo (no expuestas previamente) o activadas en la figura (6C). La unión se muestra como intensidad media de fluorescencia (IMF) del fragmento $F(ab')_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ anti-IgG humana marcado con ficoeritrina de algas rojas macrofíticas (R-PE), que se usa como anticuerpo secundario de detección. La IMF se midió mediante citometría de flujo y el valor inicial se corrigió restando la IMF del control de blanco.

La figura 7 muestra la unión de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP a células T que expresan 4-1BB de PBMC humanos preactivados con PHA-L y proleucina y reactivados con anti-CD3 humano/anti-CD28 humano. La unión se detectó con fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de Fcγ de IgG anti-humano conjugado al fluorocromo de R-ficoeritrina. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones 1.1 a 1.10 ensayadas del ejemplo 1. Para una mejor presentación, las curvas de unión se separan en cuatro puntos diferentes con la construcción 1.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP) y control B (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado no dirigido monovalente con restos de CH-CL cruzados y cargados) como curvas de comparación. La unión se controló en células T CD3+ CD8+ (figura 7A) y en células T CD3+ CD4+ (figura 7B). El nivel de expresión de 4-1BB en células T CD8 es normalmente mayor que en células T CD4. Todas las versiones se unen con una afinidad bastante similar a 4-1BB humano.

La figura 8 muestra la unión de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP a células T CD4+ o CD8+ de PBMC recientes (figura 8A) o a células T que expresan 4-1BB de PBMC humanos preactivados con PHA-L y proleucina y reactivados con anti-CD3

humano/anti-CD28 humano (figura 8B). La unión se detectó con fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de Fcγ de IgG anti-humano conjugado al fluorocromo de R-ficoeritrina. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 del ejemplo 2 y las moléculas de control, Control B, Control C, Control E y Control F ensayadas. Para una mejor presentación, las curvas de unión se separan en dos puntos diferentes con la construcción 2.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP) y control B (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado no dirigido monovalente con restos de CH-CL cruzados y cargados) como curvas de comparación. La unión se controló en células T CD45+ CD3+ CD8+ (puntos en la parte inferior) y en células T CD45+ CD3+ CD4+ (puntos en la parte superior). El nivel de expresión de 4-1BB en células T CD8 es normalmente mayor que en células T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar a 4-1BB humano, mientras que la construcción bivalente 2.3 y su Control C no dirigido muestran una IMF menor. Esto puede deberse a impedancia estérica de la unión a 4-1BB y/o una menor detección debida al segundo anticuerpo de detección inducida por el ligando de 4-1BB separado conjugado a Fc.

En la **figura 9** se muestra la unión de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigido a FAP (trímero de 4-1BBL separado de FAP, círculos sólidos) o de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contienen trímero de ligando de 4-1BB no dirigido a DP47 (trímero de 4-1BBL separado de DP47; círculos huecos) a esplenocitos de ratón activados. En particular, se muestra la unión a células T CD4+ activadas de ratón en la figura (9A) y a células T CD8+ activadas de ratón en la figura (9B). Se usó un anticuerpo de IgG1 humana P329G LALA específico de CD137 anti-ratón (clon Lob12.3) como control positivo (triángulos). La unión se caracteriza representando la IMF de un fragmento $F(ab')_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ de IgG anti-humano marcado con R-PE que se usa como anticuerpo de detección secundario frente a la concentración en nM de las construcciones de trímero de 4-1BBL separadas ensayadas. La IMF se midió mediante citometría de flujo y el valor inicial se corrigió restando la IMF del control de blanco.

La figura 10 muestra la unión de moléculas de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contienen trímero de ligando de 4-1BB **(**círculos sólidos: construcción 1.1 de molécula de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigido a FAP, círculos huecos: molécula de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB no dirigido a DP47, Control A para (A) la línea celular MV-3 y (B) la línea celular WM-266-4 de melanoma humano que

expresan proteína de activación de fibroblastos (FAP). La unión se caracteriza representando la IMF de un fragmento $F(ab')_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ de IgG anti-humano marcado con R-PE que se usa como anticuerpo de detección secundario frente a la concentración en nM de las construcciones de trímero de 4-1BBL separadas ensayadas. La IMF se midió mediante citometría de flujo y el valor inicial se corrigió restando la IMF del control de blanco.

En la **figura 11** se muestra la unión de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP a células MV-3 de melanoma humano que expresan FAP humano (figura 11A) y/o células de fibroblasto embrionario transfectadas con clon 39 de NIH/3T3-huFAP (figura 11B). La unión se detectó con fragmentos $F(ab')_2$ de cabra específicos de Fcγ de IgG anti-humano conjugados al fluorocromo de R-ficoeritrina o al fluorocromo de fluoresceína. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas. Para una mejor presentación las curvas de unión se distribuyeron para cuatro (figura 11A) o dos puntos (figura 11B), mientras que la construcción 1.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP monovalente) se usa como curva de comparación. Todas las construcciones se unen con una afinidad similar a FAP humano, a excepción de las construcciones dirigidas a FAP bivalentes (construcciones 1.5, 1.7 y 1.8). Mostraron una tendencia a tener menores valores de CE50 y una menor intensidad media de fluorescencia. Esto puede explicarse por su direccionamiento bivalente (mayor avidez, pueden unirse menos moléculas a la vez debido a la ocupación de dos epítopos, dando como resultado una menor IMF). Las diferencias estructurales también pueden explicar la diferencia entre la construcción 1.8 (direccionamiento bivalente completo) y las construcciones 1.5 y 1.7 (direccionamiento bivalente solo parcial).

En la **figura 12** se muestra la unión de las diferentes construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP a células MV-3 de melanoma humano que expresan FAP humano (figura 12A) y a células WM-266-4 (figura 12B). La unión se detectó con fragmentos $F(ab')_2$ de cabra específicos de Fcγ de IgG anti-humano conjugados al fluorocromo de R-ficoeritrina. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas. Para una mejor presentación las curvas de unión se distribuyeron para dos puntos, mientras que la construcción 2.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP monovalente) se usa como curva de comparación. Todas las construcciones se unen con una afinidad similar a FAP humano, a excepción de la construcción dirigida a

FAP bivalente 2.3. Tiene una tendencia a mostrar menores valores de CE50 y una menor intensidad media de fluorescencia. Esto puede explicarse por su direccionamiento bivalente, que da como resultado una mayor avidez pero menor ocupación de moléculas de FAP en la superficie celular, dando como resultado una IMF menor.

La figura 13 muestra la unión de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB de ratón trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP a células T CD4+ o CD8+ de esplenocitos recientes (figura 13A) o a esplenocitos de ratón que expresan 4-1BB reactivados con anticuerpos agonistas monoclonales anti-CD3 de ratón/anti-CD28 de ratón (figura 13B). La unión se detectó con fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de Fcγ de IgG anti-ratón conjugado al fluorocromo de FITC. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas. La unión se controló en células T CD3+ CD8+ (gráfica de la izquierda) y en células T CD3+ CD4+ (gráfica de la derecha). El nivel de expresión de 4-1BB en células T CD8 es normalmente mayor que en células T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar a 4-1BB de ratón.

La **figura 14** muestra la unión de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB de ratón trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP a células tumorales que expresan FAP humano. La unión se detectó con fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de Fcγ de IgG anti-ratón conjugado al fluorocromo de FITC. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas. La unión se controló en células MV-3 (figura 12 A) y en células WM-266-4 (figura 12 B). Las construcciones M.1 y M.2 de Fc(kih) de ligando de 4-1BB de ratón trimérico separado dirigido a FAP se unen con una afinidad bastante similar a FAP.

La figura 15 muestra un esquema que ilustra los principios generales del ensayo de actividad de NFkB descrito en el ejemplo 6.1 usando una línea celular indicadora. Se muestra la configuración del ensayo de activación con la línea celular indicadora HeLa que expresa 4-1BB humano. Una reticulación de 4-1BB expresado en las células indicadoras induce la activación de NFκB y la expresión de luciferasa inducida por NFκB. Después de la lisis de las células, la luciferasa puede catalizar la oxidación de luciferina a oxiluciferina. Esta reacción química se correlaciona positivamente con la fuerza de la expresión de luciferasa mediada por NFκB y puede medirse mediante la fuerza de la emisión de luz (unidades de luz liberada). La proporción de células tumorales que expresan FAP a las de la línea celular indicadora HeLa-huCD137-NFkB-luc fue de 5 a 1.

En la **figura 16** se muestra que la activación de la ruta de señalización de NFkB por la molécula de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB dirigido a FAP (construcción 1.1) es estrictamente dependiente de su unión a células diana que expresan FAP. Se cultivaron conjuntamente células HELA indicadoras de NFkB que expresan CD137 humano con las células tumorales indicadas que muestran diferentes niveles de expresión de FAP superficial. La actividad de luciferasa se ensayó tal como se describe en el ejemplo 6.1 después de cultivar las células en ausencia o presencia de moléculas que contienen 4-1BBL a las concentraciones indicadas durante 6 horas. Los círculos sólidos se refieren a la construcción 1.1. Los círculos abiertos se refieren a la molécula de unión a antígeno de fusión Fc(kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB no dirigido a DP47 (Control A). Se usó la línea celular de clon 39 de NIH/3T3-FAP humano como células diana en la gráfica (A), la gráfica (B) muestra la activación con la línea celular MV-3 como células diana y la gráfica (C) con la línea celular WM-266-4 como células diana. La actividad se caracteriza representando las unidades de luz liberada (ULL) medida durante 0,5 s frente a la concentración en nM de las construcciones de trímero de 4-1BBL separado ensayadas. Las ULL se emiten debido a la oxidación de luciferina a oxiluciferina mediada por luciferasa.

La figura 17 muestra la expresión y actividad de luciferasa inducida por activación de NFκB medida con el ensayo descrito en el ejemplo 6.1. Las cuentas de luz liberada por segundo (CPS) se miden durante 0,5 s/pocillo y se representan frente a la concentración usada de construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP. Se incubaron células indicadoras HeLa que expresan 4-1BB humano durante 6 h en ausencia (**figura 17A**) o presencia de la línea celular MV-3 de melanoma humano que expresa FAP humano reticulante (**figura 17B**) o WM-266-4 (**figura 17C**). Las CPS se midieron y representaron frente a la concentración de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP. La relación celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB humano a cinco células tumorales. Para una mejor presentación, las curvas de activación se separaron en cuatro puntos de presentación diferentes con la construcción 1.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP) y control B (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado no dirigido monovalente con restos de CH-CL cruzados y cargados) como curvas de comparación. **La figura 17A** muestra la activación sin células tumorales que expresan FAP reticulante, **la figura 17B** muestra la activación en presencia de células tumorales MV-3 que expresan FAP reticulante y **la figura 17C** muestra la activación en presencia de

células tumorales WM-266-4 que expresan FAP reticulante.

La figura 18 muestra la expresión y actividad de luciferasa inducida por activación de NFκB medida para las construcciones del ejemplo 2. Las unidades de luz liberada (ULL) se miden durante 0,5 s/pocillo y se representan frente a la concentración usada de construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP. Se incubaron células indicadoras HeLa que expresan 4-1BB humano durante 6 h en ausencia o presencia de la línea celular MV-3 de melanoma humano que expresa FAP humano reticulante o WM-266-4. Las ULL se midieron y representaron frente a la concentración de diferentes construcciones 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6 de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP y los controles B, C, E y F. La relación celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB a cinco células tumorales. Para una mejor presentación, las curvas de activación se separaron en dos gráficas de presentación con la construcción 2.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP monovalente).

En la **figura 19** se muestra la configuración del ensayo de activación con la línea celular indicadora T293-HEK que expresa 4-1BB de mono cinomolgo. Una reticulación de 4-1BB de mono cinomolgo expresado en las células indicadoras induce la activación de NFκB y la expresión de luciferasa inducida por NFκB. Después de la lisis de las células, la luciferasa puede catalizar la oxidación de luciferina a oxiluciferina. Esta reacción química se correlaciona positivamente con la fuerza de la expresión de luciferasa mediada por NFκB y puede medirse mediante la fuerza de la emisión de luz (unidades de luz liberada).

La figura 20 muestra la expresión y actividad de luciferasa inducida por la activación de NFκB. Las unidades de luz liberada (ULL) se miden durante 0,5 s/pocillo y se representan frente a la concentración usada de construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP. Se incubaron células indicadoras T293-HEK que expresan 4-1BB de mono cinomolgo durante 6 h en ausencia o presencia de la línea celular MV-3 de melanoma humano que expresa FAP humano reticulante o WM-266-4. Las ULL se midieron y representaron frente a la concentración de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP. La relación celular es de una célula indicadora T293-HEK que expresa 4-1BB a cinco células MV-3 o dos células WM-266-4. Para una mejor presentación las curvas de activación se separaron en dos gráficas diferentes con la construcción 2.1 como curva de comparación.

Figura 21: Este esquema ilustra el principio del ensayo de activación de células T descrito en el ejemplo 6.3. Se muestra la configuración esquemática del ensayo de activación con células T CD8 específicas de HLA-A2-NLV y con la línea celular MV-3 de melanoma humano HLA-A2+ FAP+ pulsadas con NLV en presencia de deferentes títulos de concentración de construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP. Las células se incubaron durante 28 h, las últimas 4 h en presencia de Golgi-Stop™ que contiene monesina. La relación de células T CD8 específicas de NLV a células tumorales MV-3 es de 1:8.

Las figuras 22 y **23** se refieren al ensayo de activación de células T CD8 específicas de HLA-A2-NLVy de la línea celular MV-3 de melanoma humano HLA-A2+ FAP+ pulsadas con NLV en presencia de títulos de concentración diferentes de diversas construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP tal como se prepararon en el ejemplo 1. Para una mejor presentación las curvas de expresión se separaron en varias gráficas de presentación con la construcción 1.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP) y Control B (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado no dirigido monovalente) como curvas de comparación. Los resultados se obtuvieron en cuatro experimentos similares independientes y muestran que la secreción prolongada de IFNγ y expresión de CD137 de células T CD8+ específicas de NLV es estrictamente dependiente de la activación simultánea de células T mediante el reconocimiento de complejos de NLV-HLA-A2 (señal 1) y de la activación de 4-1BB mediante 4-1BB separado humano dirigido a FAP (señal 2). El efecto de la regulación positiva de 4-1BB se muestra en las gráficas de la figura 22, mientras que el efecto de la expresión de INFγ de células T CD8+ se representa en las gráficas de la figura 23. Siempre se muestra la frecuencia en porcentaje de células positivas en la población total de células T CD8+. Todas las variantes dirigidas a FAP indujeron una mejora similar de la activación de células T CD8 activadas con péptido NLV mostradas en la figura 22 como regulación positiva de 4-1BB (bucle de retroalimentación positivo) y en la figura 23 como expresión de IFNγ después de 24 h de estimulación. Las diferencias de las curvas se encuentran en el intervalo de la desviación de error normal y no son significativas.

Las figuras 24 y **25** se refieren al ensayo de activación de células T CD8 específicas de HLA-A2-NLVy de la línea celular MV-3 de melanoma humano HLA-A2+ FAP+ pulsadas con NLV en presencia de títulos de concentración de diversas construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a FAP del ejemplo 2. Para una mejor presentación, las curvas de

expresión se separaron en dos gráficas de presentación con la construcción 2.1 (Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido a FAP monovalente) y Control B como curvas de comparación. Todas las construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigidas a FAP muestran una mejora de la activación similar de células T CD8 específicas de péptido HLA-A2-NLV mostrada en la figura 24 como regulación positiva de 4-1BB (bucle de retroalimentación positivo) y en la figura 25 como expresión de IFN□ tras 24 h de estimulación. Las diferencias de las curvas se encuentran en el intervalo de la desviación de error normal y no son significativas.

Figura 26: Este esquema ilustra el experimento tal como se describe en el ejemplo 6.4.

La figura 27 muestra la inducción de la proliferación de células T CD8+. Se muestra la frecuencia de células T CD8+ en proliferación frente a la concentración de construcciones ensayadas.

La figura 28A se refiere al experimento FC de una sola dosis de construcción 1.2 y Control B en ratones NOG sanos. Se muestra el declive de la concentración de la construcción a lo largo del tiempo. **La figura 28B** muestra los resultados del experimento FC de una sola dosis de construcciones 2.1, 2.3, Control B y Control C en ratones NOG portadores de tumores humanizados con células madre. La figura 28C se refiere al experimento FC de una sola dosis que compara las construcciones 2.1 y 2.3 en ratones NOG sanos.

La figura 29 muestra componentes para el ensamblaje de los ligandos de 4-1BB humanos triméricos separados. La figura (29A) muestra al ligando dimérico que está fusionado en el extremo C-terminal al dominio CL humano con las mutaciones E123R y Q124K (restos cargados) y la figura (29B) muestra al ligando de 4-1BB monomérico fusionado al dominio CH1 humano con las mutaciones K147E y K213E (restos cargados). Componentes para el ensamblaje de la molécula de unión a antígeno de ligando de 4-1BB humano trimérico separado (71-254) dirigido a CD19 bivalente (construcción 3.3). La figura (29C) muestra al ligando dimérico fusionándose al extremo C-terminal de la cadena de Fc agujero de IgG1. La figura (29D) muestra al ligando monomérico fusionándose al extremo C-terminal de la cadena de Fc pomo de IgG1.

La figura 30 muestra las construcciones de moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de 4-1BBL dirigidas a CD19, 3.1 a 3.6 de la invención. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 3. Los

dominios VH y VL son aquellos del anticuerpo anti-CD19, 8B8-018, el punto negro grueso representa la modificación de pomos en agujeros. * simboliza modificaciones de aminoácidos en el dominio CH1 y CL (los denominados restos cargados).

En la **figura 31A** se ilustra la estrategia de aleatorización para las regiones CDR del clon progenitor 8B8. Se muestran los dominios variables del clon progenitor 8B8 y las regiones CDR (recuadradas) de acuerdo con la numeración de Kabat. (X) representa las posiciones aleatorizadas. **La figura 31B** muestra la descripción esquemática de las estrategias de generación de la biblioteca. Se muestra la estrategia de amplificación PCR y clonación usada para la generación de la biblioteca basada en 8B8 con A) regiones CDR1 y CDR2 aleatorizadas en la cadena ligera y pesada o B) regiones CDR1 y CDR3 aleatorizadas en la cadena ligera y en la región CDR3 de la cadena pesada. Se indican las enzimas respectivas usadas para clonar en el fagémido.

La figura 32 muestra el alineamiento del clon 8B8 progenitor anti-CD19 con las moléculas de unión maduradas por afinidad seleccionadas. Se muestran las secuencias del clon 8B8 y de todas las moléculas de unión maduradas por afinidad. Se recuadran las CDR tanto de la cadena pesada como de la ligera.

La figura 33 se refiere al análisis SPR del clon progenitor 8B8 y sus variantes maduradas por afinidad. Se muestran los sensogramas del clon 8B8 y sus derivados madurados por afinidad que están desprovistos de los puntos calientes N27d y N28 de LCDR1.

La figura 34A ilustra la configuración del ensayo que mide la unión simultánea de 4-1BBL trimérico separado dirigido a CD19 a hu4-1BB y a huCD19 (ejemplo 8.2).

Las gráficas en la **figura 35** muestran la unión simultánea de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 4.4 de moléculas de unión a antígeno de fusiones de Fc de 4-1BBL trimérico dirigidas a CD19 (Analito 1) a 4-1BB humano y CD19 humano (Analito 2) inmovilizados.

La figura 36 muestra la unión de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CD19 a células T CD4 y CD8 que expresan 4-1BB de PBMC preactivados con proleucina y reactivados con anti-CD3 humano/anti-CD28 humano. La unión se detectó con fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de Fcγ de IgG anti-humano conjugado al fluorocromo de R-ficoeritrina. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas. Para una mejor

presentación las curvas de unión se separan en tres diferentes gráficas con la construcción 3.4 y control F (huIgG1 P329G LALA de control de isotipo) como curvas de comparación. La unión se controló en células T CD45+ CD3+ CD8+ (figura 36A) y en células T CD45+ CD3+ CD4+ (figura 36B). El nivel de expresión de 4-1BB en células T CD8 es normalmente mayor que en células T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar a 4-1BB humano.

La figura 37 muestra la unión de moléculas de unión a antígeno de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CD19 a líneas celulares de linfoma de células B que expresan CD19 humano: SU-DHL-8 de linfoma difuso de células B grandes no de Hodgkin (37A), Nalm6 de leucemia linfoide aguda de células B precursoras (37B), Toledo, de linfoma linfoblástico difuso de células grandes (37C) y OCI-Ly18 de linfoma difuso de células B grandes (37D). La unión se detectó con fragmentos $F(ab')_2$ de cabra específicos de Fcγ de IgG anti-humano conjugados al fluorocromo de R-ficoeritrina. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas. Para una mejor presentación las curvas de unión se separan en tres diferentes gráficas con la construcción 3.4 y control F (huIgG1 P329G LALA de control de isotipo) como curvas de comparación. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar a CD19 humano.

La figura 38 se refiere a la expresión y actividad de luciferasa inducida por la activación de NFκB de moléculas de unión a antígeno de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CD19. Las unidades de luz liberada (ULL) se miden durante 0,5 s/pocillo y se representan frente a la concentración usada de las construcciones 3.1 y 2.2 de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CD19 y las moléculas de control B y C. Se incubaron células indicadoras HeLa que expresan 4-1BB humano durante 7,5 h en ausencia o presencia de células SU-DHL-8 o de Pfeiffer que expresan CD19 humano reticulante. Las ULL se midieron y representaron frente a la concentración de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CD19. La relación celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB a 2,5 o cinco células tumorales.

La figura 39 muestra la unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 en células de adenocarcinoma gástrico humano que expresan CEA. Basándose en estos datos se seleccionó la variante humanizada 1 para incluirla en las moléculas de unión a antígeno de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico dirigido a CEA.

La figura 40 muestra las construcciones de moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de 4-1BBL dirigidas a CEA, 5.1 a 5.6 de la invención. La preparación y producción de estas construcciones se describe en el ejemplo 11. Los dominios VH y VL son aquellos del anticuerpo anti-CEA, T84.66-LCHA, el punto negro grueso representa la modificación de pomos en agujeros. * simboliza modificaciones de aminoácidos en el dominio CH1 y CL (los denominados restos cargados).

La figura 41A muestra la descripción esquemática de NA3B3A2-avi His humano, el antígeno usado para evaluar la unión de moléculas de unión a antígeno de Fc(kih) de 4-1BBL separado trimérico dirigido a CEA. **La figura 41 B** ilustra la configuración del ensayo que mide la unión simultánea de 4-1BBL trimérico separado dirigido a CEA a hu4-1BB y a NA3B3A2 humano (ejemplo 12.1).

Las gráficas en la **figura 42** muestran la unión simultánea de las construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 de moléculas de unión a antígeno de fusiones de Fc de 4-1BBL trimérico dirigidas a CEA (Analito 1) a 4-1BB humano y a NA3B3A2 humano (Analito 2) inmovilizados.

La figura 43 muestra la unión de diferentes construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CEA a células T CD4 y CD8 que expresan 4-1BB de PBMC humanos preactivados con PHA-L y proleucina y reactivados con anti-CD3 humano/anti-CD28 humano. La unión se detectó con fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de Fcγ de IgG anti-humano conjugado al fluorocromo de R-ficoeritrina. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas. Para una mejor presentación las curvas de unión se separan en dos diferentes gráficas con la construcción 5.4 y control F (huIgG1 P329G LALA de control de isotipo) como curvas de comparación. La unión se controló en células T CD45+ CD3+ CD8+ (puntos en la parte inferior) y en células T CD45+ CD3+ CD4+ (puntos en la parte superior). El nivel de expresión de 4-1BB en células T CD8 es normalmente mayor que en células T CD4. Todas las construcciones se unen con una afinidad bastante similar a 4-1BB humano.

La figura 44 muestra la unión de construcciones de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CEA a la línea celular gástrica humana MKN-45 (izquierda) y a la línea celular LS180 humana de adenocarcinoma colorrectal (derecha) que expresan CEA humano. La unión se detectó con fragmentos $F(ab')_2$ de cabra específicos de Fcγ de IgG anti-humano

conjugados al fluorocromo de R-ficoeritrina. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) frente a la concentración de las construcciones ensayadas.

La figura 45 se refiere a la expresión y actividad de luciferasa inducida por la activación de NFκB de moléculas de unión a antígeno de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CEA. Las unidades de luz liberada (ULL) se miden durante 0,5 s/pocillo y se representan frente a la concentración usada de construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 de Fc(kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico separado dirigido o no dirigido a CEA y moléculas de control. Se incubaron células indicadoras HeLa que expresan 4-1BB humano durante 6 h en ausencia o presencia de la línea celular MKN-45 de cáncer gástrico humano que expresa CEA humano reticulante. La relación celular es de una célula indicadora HeLa que expresa 4-1BB a tres células tumorales.

En las **figuras 46A y 46B** se muestran los componentes para el ensamblaje del ligando de OX40 humano trimérico separado dirigido a FAP monovalente (construcción 6.1). La figura 46A se refiere a ligando dimérico fusionado a dominio CL de IgG1 humana, la figura 46B se refiere al dominio CH1 de IgG1 humana fusionado a ligando monomérico. **La figura 46C** muestra la construcción 6.1 de molécula de unión a antígeno que contiene trímero de OX40L dirigido a FAP. En la **figura 46D** se muestra a la IgG1 PGLALA humana "no dirigida" a DP47 (control F).

La figura 47A muestra la unión de OX40L humano trimérico separado dirigido a FAP a células WM-266-4 positivas a FAP. Las células WM-266-4 expresan altos niveles de proteína activadora de fibroblastos humana (huFAP). Solo las construcciones de Fc(kih) de ligando de OX40 dirigido a FAP (cuadrado relleno) pero no el control 5 (rombo relleno) se unieron a células WM-266-4. La unión se muestra como intensidad media de fluorescencia (IMF) del fragmento $F(ab')_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ anti-IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se usa como anticuerpo secundario de detección. La IMF se midió mediante citometría de flujo. El eje X muestra la concentración de construcciones de anticuerpo**. La figura 47B** muestra la unión de la construcción de Fc(kih) de ligando de OX4O dirigido a FAP a células NucLigt Red A549 negativas a FAP humano y Ox40 humano. La construcción de Fc(kih) de ligando OX4O dirigido a FAP no mostró unión a células tumorales A549 negativas a OX40 y negativas a FAP. La unión se muestra como intensidad media de fluorescencia (IMF) del fragmento $F(ab')_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ anti-IgG humana marcado con FITC, que se usa como

anticuerpo secundario de detección. La IMF se midió mediante citometría de flujo y el valor inicial se corrigió restando la IMF del control de blanco.

En la **figura 48A** se muestra la unión de FAP-Ox40L a células T CD4 humanas en reposo y activadas. Ox40 no se expresa en células T CD4 en reposo (lado izquierdo). En ausencia de células que expresan Ox40 humano no se observó unión (gráficas de la izquierda). Después de la activación de PBMC humanos Ox40 se regula positivamente en células T CD4+ (lado derecho). FAP-Ox40L se unió a células T CD4 activadas Ox40+. La unión se muestra como intensidad media de fluorescencia (IMF) del fragmento $F(ab')_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ anti-IgG humana marcado con FITC, que se usa como anticuerpo secundario de detección. La IMF se midió mediante citometría de flujo y el valor inicial se corrigió restando la IMF del control de blanco. El eje X muestra la concentración de construcciones de anticuerpo. **La figura 48B** muestra que Ox40 no se expresa en células T CD8 humanas en reposo (lado izquierdo). En ausencia de células que expresan Ox40 humano no se observó unión (gráficas de la izquierda). Después de la activación de PBMC humanos Ox40 se regula positivamente en células T CD8+ (lado derecho). La expresión de Ox40 en células T CD8+ humanas es menor que en células T CD4+ y varía entre donantes y puntos temporales. La expresión de Ox40 fue baja en las células T CD8 representadas. FAp-Ox40L se unió a células T CD8 activadas Ox40+. La unión se muestra como intensidad media de fluorescencia (IMF) del fragmento $F(ab')_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ anti-IgG humana marcado con FITC, que se usa como anticuerpo secundario de detección. La IMF se midió mediante citometría de flujo y el valor inicial se corrigió restando la IMF del control de blanco. El eje X muestra la concentración de construcciones de anticuerpo.

En la **figura 49** se demuestra la activación de la ruta de señalización de NFκB mediante la molécula de unión a antígeno de OX40L humano trimérico separado dirigido a FAP (FAP-OX40L) en células indicadoras HeLa_hOx40_NFkB_Luc1. Se muestra la activación con (gráfica de la derecha) o sin (gráfica de la izquierda) reticulación mediante anticuerpo secundario. Las células indicadoras se cultivaron durante 5 horas en presencia de FAP-OX40L a las concentraciones indicadas con o sin fragmento secundario reticulante $F(ab)_2$ de IgG de cabra específico de Fcγ anti-huIgG1 policlonal a una relación 1:2. La actividad de luciferasa se evaluó tal como se describe en el ejemplo 6.1. La actividad se caracteriza representando las unidades de luz liberada (ULL) medida durante 0,5 s frente a la concentración en nM de la construcción ensayada. Las ULL se emiten debido a la oxidación de luciferina a oxiluciferina mediada por luciferasa.

En la **figura 50A** se muestra la activación de NFκB mediante FAP-OX40L en células indicadoras HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 en presencia de células positivas a FAP. Se muestra la activación de la ruta de señalización de NFκB mediante FAP-OX40L en las células indicadoras en presencia de células NIH-3T3 que expresan bajos niveles de FAP humana (relación de 3 células tumorales FAP+ a 1 célula indicadora). La actividad de luciferasa mediada por NFκB se caracterizó representando las unidades de luz liberada (ULL), medida durante 0,5 s, frente a la concentración en nM de los compuestos ensayados. Las ULL se emiten debido a la oxidación de luciferina a oxiluciferina mediada por luciferasa. Los valores se corrigen inicialmente restando las ULL del control de blanco. Para una mejor comparación, el área bajo la curva de las curvas de respuesta a la dosis representadas respectivas se cuantificaron como marcador para la capacidad agonista de cada construcción. La comparación se ilustra en la **figura 50B**. El área se calculó usando GraphPad Prism. Los valores se corrigen inicialmente restando el valor del control de blanco.

La figura 51 muestra la coestimulación mediada por OX40 de PBMC humanos en reposo activador por TCR de manera subóptima (ejemplo 15.5). La hiper-reticulación de FAP-Ox40L por las presentes células de clon 39 de NIH/3T3-huFAP promovieron fuertemente la supervivencia y proliferación en células T CD4 y CD8 humanas. Se muestra el recuento de eventos de células T CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha). Los valores iniciales de las muestras que contenían solo el anti-CD3 humano (clon V9, huIgG1), PBMC en reposo y clon 39 de NIH/3T3-huFAP se restaron. Por lo tanto, aquí se muestra el efecto potenciador de la coestimulación de OX40 pero no el efecto de la estimulación subóptima de anti-CD3 *per se*. En las figuras en la parte inferior se muestra el rescate de la proliferación de PBMC humanos en reposo con FAP-Ox40L inmovilizado en la superficie celular con TCR subóptimo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al que se usa generalmente en la técnica a la que pertenece la presente invención. Con el fin de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y siempre que sea adecuado, los términos usados en singular también incluirán el plural y *vice versa*.

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 anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y proteínas de unión a antígeno de armazón.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana**" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En un aspecto, el resto de unión a antígeno es capaz de activar la señalización a través de su antígeno de célula diana. En un aspecto particular, el resto de unión a antígeno es capaz de dirigir la entidad a la que está unido (por ejemplo, el trímero de ligando de la familia de TNF) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico. Los restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, tal como se define adicionalmente en el presente documento. Además, los restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana incluyen proteínas de unión a antígeno de armazón tal como se definen adicionalmente en el presente documento, por ejemplo, dominios de unión que se basan en las proteínas de repetición diseñadas en los dominios de repetición diseñados (véase, por ejemplo, el documento WO 2002/020565).

En relación a un anticuerpo o a un fragmento del mismo, la expresión "resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana" se refiere a la parte de la molécula que comprende el área a la que se une específicamente y es complementario a la totalidad o a parte de un antígeno. Puede proporcionarse un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). En particular, un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

El término "**anticuerpo**" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

La expresión "**anticuerpo monoclonal**", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de

anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto para posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que aparecen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes presentes generalmente en cantidades menores. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante o antígeno.

La expresión anticuerpo "**monoespecífico**", tal como se usa en el presente documento indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios cada uno que se unen al mismo epítopo del mismo antígeno. 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 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 dentro de la presente solicitud indica la presencia de un número especificado de sitios de unión en una molécula de unión a antígeno. Como tales, los términos "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de unión a antígeno.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto", y "anticuerpo completo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa. Los "**anticuerpos nativos**" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variantes. Por ejemplo, los anticuerpos de clase IgG nativos 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 un anticuerpo 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, γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3), γ4 (IgG4), α1 (IgA1) y α2 (IgA2). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

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, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, fragmentos cross-Fab; 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 and 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 los Estados Unidos Nº 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 digestión de papaína de anticuerpos intactos produce dos fragmentos de

unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" que contienen cada uno los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada y también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Tal como se usa en el presente documento, Por lo tanto, la expresión "**fragmento Fab**" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL y un dominio constante de una cadena ligera (CL), y un dominio VH y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH son fragmentos Fab' en los que el resto (o los restos de cisteína) de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con antígeno (dos fragmentos Fab) y una parte de la región Fc.

Las expresiones "**fragmento cross-Fab**" o "fragmento xFab" o "fragmento Fab sobrecruzado" se refieren a un fragmento Fab, en el que bien las regiones variables o bien las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada están intercambiadas. Son posibles dos composiciones de cadena diferentes de una molécula de Fab sobrecruzado y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos de la invención: Por un lado, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de Fab están intercambiadas, es decir, la molécula de Fab sobrecruzado comprende una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena ligera (VL) y de la región constante de cadena pesada (CH1), y una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena pesada (VH) y de la región constante de cadena ligera (CL). Esta molécula de Fab sobrecruzado también se cita como CrossFab $_{(VLVH)}$. Por otra parte, cuando las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada del Fab están intercambiadas, la molécula de Fab sobrecruzada comprende una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena pesada (VH) y la región constante de cadena ligera (CL), y una cadena peptídica compuesta de la región variable de cadena ligera (VL) y de la región constante de cadena pesada (CH1). Esta molécula de Fab sobrecruzado también se cita como CrossFab $_{(CLCH1)}$.

Un "fragmento Fab monocatenario" o "**scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo (CL) y un enlazador, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazador tienen uno de los siguientes órdenes en dirección de N-terminal a C-terminal: a) VH-CH1-enlazador-VL-CL, b)

VL-CL-enlazador-VH-CH1, c) VH-CL-enlazador-VL-CH1 o d) VL-CH1-enlazador-VH-CL; y en el que dicho enlazador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan a través del enlace disulfuro natural entre el dominio CL y el dominio CH1. Además, las moléculas de Fab monocatenario pueden estabilizarse adicionalmente mediante la generación de enlaces disulfuro intercadena mediante la inserción de restos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 en la cadena pesada variable y la posición 100 en la cadena ligera variable según la numeración de Kabat).

Un "fragmento Fab monocatenario sobrecruzado" o "**x-scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 de anticuerpo (CH1), un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo (CL) y un enlazador, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazador tienen uno de los siguientes órdenes en dirección de N-terminal a C-terminal: a) VH-CL-enlazador-VL-CH1 y b) VH-CH1-enlazador-VH-CL; en el que VH y VL forman juntos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno y en el que dicho enlazador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos. Además, las moléculas de x-scFab pueden estabilizarse adicionalmente mediante la generación de enlaces disulfuro intercadena mediante la inserción de restos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 en la cadena pesada variable y la posición 100 en la cadena ligera variable según la numeración de Kabat).

Un “**fragmento variable monocatenario** (**scFv**)” es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de un anticuerpo, conectadas con un péptido enlazador corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador es normalmente rico en glicina para su flexibilidad, así como en serina o treonina para su solubilidad, y pueden bien conectar el extremo N-terminal de la V_H con el extremo C-terminal de la V_L, o viceversa. Esta proteína retiene la especificidad del anticuerpo original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y de la introducción del enlazador. Los anticuerpos scFv, por ejemplo, se describen en Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio VH, es decir, son capaces de ensamblarse junto con un dominio VL, o de un dominio VL, es decir, son capaces de ensamblarse junto con un dominio VH a un sitio de unión a antígeno funcional y de este modo proporcionar la propiedad de unión a antígeno de los anticuerpos de longitud completa.

Las "**proteínas de unión a antígeno de armazón**" se conocen en la técnica, por ejemplo, se han usado fibronectina y proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) como estructuras alternativas para dominios de unión a antígeno, véase, por ejemplo, Gebauer y Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009) y Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008). En un aspecto de la invención, se selecciona una proteína de unión a antígeno de armazón del grupo que consiste en CTLA-4 (Evibody); lipocalinas (anticalina), una molécula procedente de proteína A, tal como dominio Z de proteína A (Affibody), un dominio A (Avimer/Maxibody), una transferrina sérica (*trans*-body); una proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio variable de cadena ligera o cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio, sdAb), un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (nanocuerpo, aVH), fragmentos V_{NAR}, una fibronectina (AdNectin), un dominio de lectina de tipo C (Tetranectina); un dominio variable de beta lactamasa receptora de nuevo antígeno (fragmentos V_{NAR}), una gamma-cristalina o ubiquitina humana (moléculas Affilin); un dominio de tipo kunitz de inhibidores de proteasa humana, microcuerpos, tales como las proteínas de la familia de knotina, aptámeros peptídicos y fibronectina (adnectina).

CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) es un receptor de la familia de CD28 expresado principalmente en linfocitos T CD4+. Su dominio extracelular tiene un dominio variable similar a un plegamiento de Ig. Los bucles que corresponden a CDR de anticuerpos pueden sustituirse con secuencias heterólogas para conferir diferentes propiedades de unión. Las moléculas CTLA-4 diseñadas para tener diferentes especificidades de unión también se conocen como Evibodies (por ejemplo, el documento US7166697B1). Los evibodies tienen aproximadamente el mismo tamaño que la región variable aislada de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio). Para más detalles, véase Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001).

Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrófobas pequeñas, tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Tienen una estructura de beta-lámina rígida con una serie de bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que puede diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana. Las anticalinas tienen entre 160-180 aminoácidos de tamaño, y se derivan de las lipocalinas. Para detalles adicionales véase Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 y US20070224633.

Un affibody es una estructura derivada de proteína A de *Staphylococcus aureus* que puede diseñarse para unirse a un antígeno. El dominio consiste en un paquete de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado bibliotecas mediante aleatorización de restos superficiales. Para detalles adicionales véase Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) y el documento EP 1641818A1.

Los avimeros son proteínas multidominio derivadas de la familia de armazón de dominio A. Los dominios nativos de aproximadamente 35 aminoácidos adoptan una estructura de enlace disulfuro definida. La diversidad se genera mediante reordenamiento de la variación natural mostrada por la familia de dominios A. Para detalles adicionales véase Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) y Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (Junio de 2007).

Una transferrina es una glucoproteína monomérica de transporte en suero. Las transferrinas pueden diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana mediante inserción de secuencias peptídicas en un bucle superficial permisivo. Los ejemplos de estructuras de transferrina diseñadas incluyen el Trans-body. Para detalles adicionales véase J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999).

Las proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) se derivan de anquirina, que es una familia de proteínas que median la unión de proteínas integrales de membrana al citoesqueleto. Una sola repetición de anquirina es un motivo de 33 restos que consiste en dos hélices alfa y un giro beta. Pueden diseñarse para unirse a diferentes antígenos diana aleatorizando restos en la primera hélice alfa y un giro beta de cada repetición. Su interfaz de unión puede aumentarse aumentando el número de módulos (un método de maduración de afinidad). Para detalles adicionales véase J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) y J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) y el documento US20040132028A1.

Un anticuerpo de un solo dominio es un fragmento de anticuerpo que consiste en un solo dominio de anticuerpo variable monomérico. Los primeros dominios individuales procedían del dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo para los camélidos (nanocuerpos o fragmentos V_H H). Además, la expresión "anticuerpo de un solo dominio" incluye un dominio variable de cadena pesada humana (aVH) o fragmentos V_{NAR} procedentes de tiburones.

La fibronectina es una estructura que puede diseñarse para unirse a un antígeno. Las adnectinas consisten en una estructura de la secuencia natural de aminoácidos del 10º dominio de las 15 unidades de repetición de fibronectina

humana de tipo III (FN3). Pueden diseñarse tres bucles en un extremo del sándwich beta para permitir que una adnectina reconozca específicamente una diana terapéutica de interés. Para detalles adicionales véase Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005), US20080139791, WO2005056764 y US6818418B1.

Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento combinatorias que consisten en una proteína de estructura constante, típicamente tiorredoxina (TrxA) que contiene un bucle peptídico variable comprimido insertado en el sitio activo. Para detalles adicionales véase Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Los microbodies se derivan de microproteínas de origen natural de 25-50 aminoácidos de longitud que contiene 3-4 puentes de cisteína; los ejemplos de microproteínas incluyen KalataBI y conotoxina y knottinas. Las microproteínas tienen un bucle que puede diseñarse para incluir hasta 25 aminoácidos sin afectar al plegamiento general de la microproteína. Para detalles adicionales de dominios de knottina diseñados, véase el documento WO2008098796.

Una "**molécula de unión a antígeno que se une al mismo epítopo**" como molécula de referencia se refiere a una molécula de unión a antígeno que bloquea la unión de la molécula de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más, y por el contrario, la molécula de referencia bloquea la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más.

La expresión "**dominio de unión a antígeno**" se refiere a la parte de una molécula de unión a antígeno que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a una parte o a la totalidad de un antígeno. En los casos donde el antígeno es grande, una molécula de unión a antígeno puede unirse únicamente a una parte concreta del antígeno, denominándose esta parte epítopo. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables (también denominados regiones variables). Preferentemente, 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).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**determinante antigénico**" es sinónimo de "antígeno" 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) sobre una macromolécula polipeptídica a la que se une un anticuerpo, 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 útiles como antígenos en el presente documento 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.

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 una molécula de unión a antígeno para unirse a un antígeno 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 (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 una molécula de unión a antígeno a una proteína no relacionado es menos de aproximadamente el 10 % de la unión de una molécula de unión a antígeno al antígeno medida, por ejemplo, mediante SPR. En determinadas realizaciones, una molécula que se une al antígeno tiene una constante de disociación (Kd) 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**" o "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). 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, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar en general por su constante de disociación (Kd), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (koff y kon, 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 comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Un método particular para medir la afinidad es resonancia de plasmón superficial (SPR).

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 determinadas realizaciones, el antígeno de célula diana es un antígeno sobre la superficie de una célula tumoral. En una realización, el antígeno de célula diana se selecciona entre el grupo que consiste en, antígeno carcinoembrionario (CEA), proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD19, CD20 y CD33.

La expresión "**antígeno carcinoembriónico (CEA)**", también conocido como molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembriónico (CACAM5), se refiere a un CEA nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CEA humano se muestra en UniProt Nº de acceso P06731 (versión 151, SEC ID Nº: 28). CEA se ha identificado hace tiempo como un antígeno asociado a tumores (Gold y Freedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965; Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002). Clasificado originalmente como una proteína expresada solo en tejido fetal, actualmente se ha identificado a CEA en diversos tejidos adultos normales. Estos tejidos son principalmente de origen epitelial, incluyendo células de los tractos gastrointestinal, respiratorio, y urogenital, y células del colon, cuello de útero, glándulas sudoríparas, y próstata (Nap et al., Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988; Nap et al., Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992). Los tumores de origen epitelial, así como sus metástasis, contienen CEA como antígeno asociado a tumores. Aunque la presencia de CEA en sí no indica la transformación en célula cancerosa, la distribución de CEA es indicativa. En tejido normal, CEA se expresa generalmente en la superficie apical de la célula (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)), haciéndolo inaccesible a anticuerpos en el torrente sanguíneo. A diferencia del tejido normal, CEA tiende a estar sobreexpresado en toda la superficie de células cancerosas (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). Este cambio en el patrón de expresión hace que CEA sea accesible a la unión de anticuerpos en

células cancerosas. Además, la expresión de CEA aumenta en células cancerosas. Además, la expresión aumentada de CEA promueve las adhesiones intercelulares aumentadas, lo que puede dar lugar a metástasis (Marshall J., Semin Oncol., 30(a Supl. 8):30-6, 2003). La prevalencia de la expresión de CEA en diversas entidades tumorales es generalmente muy alta. En concordancia con los datos publicados, los análisis propios efectuados en muestras de tejidos confirmaron su alta prevalencia, con aproximadamente un 95 % en carcinoma colorrectal (CCR), 90 % en cáncer pancreático, 80 % en cáncer gástrico, 60 % en cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC, donde se expresa conjuntamente con HER3), y 40 % en cáncer de mama; se encontró baja expresión en cáncer microcítico de pulmón y glioblastoma.

CEA se escinde fácilmente de la superficie celular y se desprende al torrente sanguíneo desde los tumores, bien directamente o a través del sistema linfático. Debido a esta propiedad, los niveles de CEA en suero se han usado como marcador clínico para el diagnóstico de cánceres y para la exploración de la recurrencia de cánceres, particularmente del cáncer colorrectal (Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992; Chau I., et al., J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004; Flamini et al., Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006).

La expresión "**proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP)**", también conocido como proteoglucano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4) se refiere a cualquier MCSP nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de MCSP humano se muestra en UniProt Nº de acceso G6UVK1 (versión 103, SEC ID Nº: 29). La expresión "**receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**", también denominado proto-oncogén c-ErbB-1 o proteín-tirosina cinasa receptora erbB-1, se refiere a un EFGR nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de EGFR humano se muestra en UniProt Nº de acceso P00533 (versión 211, SEC ID Nº: 30).

El término "**CD19**" se refiere al antígeno CD19 de linfocitos B, también conocido como antígeno B4 de la superficie de linfocitos B o antígeno Leu-12 de la superficie de células T e incluye cualquier CD19 nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres

humanos) primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD19 humano se muestra en UniProt Nº de acceso P15391 (versión 160, SEC ID Nº: 31). El término abarca CD19 humano no procesado de "longitud completa" así como cualquier forma de CD19 humano que sea el resultado del procesamiento en la célula siempre que el anticuerpo tal como se comunica en el presente documento se una al mismo. CD19 es un receptor de la superficie celular estructuralmente distinto expresado en la superficie de células B humanas, incluyendo, pero sin limitación, células pre-B, células B en desarrollo temprano (es decir, células B inmaduras), células B maduras hasta la diferenciación terminal en células plasmáticas, y células B malignas. CD19 por la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas pre-B (ALL), linfomas no de Hodgkin, leucemias linfocítica crónica de células B (CLL), leucemias prolinfocíticas, tricoleucemias, leucemias linfocíticas agudas comunes, y algunas leucemias linfoblásticas agudas nulas. La expresión de CD19 en células plasmáticas sugiere además que puede expresarse en tumores de células B diferenciados, tales como mieloma múltiple. Por lo tanto, el antígeno CD19 es una diana para inmunoterapia en el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, la leucemia linfocítica crónica y/o la leucemia linfoblástica crónica.

“**CD20**” se refiere al antígeno CD20 de linfocitos B, también conocido como miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios transmembrana (MS4A1), antígeno B1 de la superficie de linfocitos B o antígeno de la superficie de leucocitos Leu-16, e incluye cualquier forma nativa de CD20 de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD20 humano se muestra en UniProt Nº de acceso P11836 (versión 149, SEC ID Nº: 32). “**CD33**” se refiere al antígeno CD33 de la superficie de células mieloides, también conocido como SIGLEC3 o gp67, e incluye cualquier forma nativa de CD33 de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD33 humano se muestra en UniProt Nº de acceso P20138 (versión 157, SEC ID Nº: 33).

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 de la molécula de unión a antígeno 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. Los bucles hipervariables ejemplares suceden en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3) suceden en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2, y 95-102 de H3. (Kabat et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 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.

Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "restos determinantes de la especificidad" o "SDR" que son restos que están en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones de las CDR llamadas CDR-abreviadas, o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, y a-CDR-H3) suceden en los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2, y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos FR) se numeran en el presente documento según

Kabat et al*., anteriormente citado*.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**madurado por afinidad**" en el contexto de las moléculas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) se refiere a una molécula de unión a antígeno que procede de una molécula de unión a antígeno de referencia, por ejemplo, mediante mutación, que se une al mismo antígeno, preferentemente se une al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia; y tiene una mayor afinidad por el antígeno que la de la molécula de unión a antígeno de referencia. La maduración por afinidad generalmente implica la modificación de uno o más restos de aminoácidos en una o más CDR de la molécula de unión a antígeno. Típicamente, la molécula de unión a antígeno madurada por afinidad se une al mismo epítopo que la molécula de unión a antígeno de referencia inicial.

"**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.

Una "**armazón humano aceptor**", para los fines del presente documento es un armazón que comprende la secuencia de aminoácidos del armazón del dominio variable de cadena ligera (VL) o armazón de un dominio variable de cadena pesada (VH) derivados de armazón de inmunoglobulina humana o un armazón consenso humano, tal como se define a continuación. Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o de un armazón consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, El armazón aceptor humano de VL es idéntico en secuencia al armazón de inmunoglobulina humana de VL o al armazón consenso humano.

La expresión anticuerpo "**quimérico**" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena ligera y/o pesada procede de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie diferente.

La "**clase**" de un anticuerpo 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.

Un anticuerpo "**humanizado**" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) se corresponden con aquellas de un anticuerpo humano, y todas o sustancialmente todas las Fr se corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "**forma humanizada**" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanos" abarcadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente a partir de aquella del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en lo referente a la unión a C1q y/o la unión a receptor de Fc (FcR).

Un anticuerpo "**humano**" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con aquella de un anticuerpo producir por un ser humano o una célula humana o que se deriva de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanas. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

La expresión "dominio Fc" o "**región Fc**" se usa en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Una región Fc de IgG comprende un domino CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG. El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana se extiende normalmente desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 231 hasta un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 340. En una realización, se une una cadena de carbohidrato al dominio CH2. El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa un dominio CH2 variante. El "dominio CH3" comprende el grupo de restos de C-terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es

decir, desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición 341 hasta un aminoácido aproximadamente en la posición 447 de una IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida ("pomo") en una cadena del mismo y una "cavidad" correspondiente introducida ("agujero") en la otra cadena del mismo; véase la Patente de los Estados Unidos Nº 5.821.333, incorporada al presente documento expresamente por referencia). Dichos dominios CH3 variantes pueden usarse para promover la heterodimerización de dos cadenas pesadas de anticuerpo no idénticas tal como se describe en el presente documento. En una realización, una 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.

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). 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, una modificación de pomo comprende la sustitución de aminoácidos T366W en una de las dos subunidades del dominio Fc, y la modificación de agujero comprende las sustituciones de aminoácidos T366S, L368A y Y407V en la otra de las dos subunidades del domino Fc. En una realización específica adicional, la subunidad del domino Fc que comprende la modificación de pomo comprende

adicionalmente la sustitución de aminoácidos S354C, y la subunidad del domino Fc que comprende la modificación de agujero comprende adicionalmente la sustitución de aminoácidos Y349C. La introducción de estos dos restos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades de la región Fc, de este modo estabilizando adicionalmente al dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)). La numeración es de acuerdo con el índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Una "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" pretende incluir variantes alélicas de origen natural de la región Fc de una inmunoglobulina así como variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o eliminaciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar funciones efectoras (tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Por ejemplo, pueden eliminarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin una pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse de acuerdo con varias reglas generales conocidas en la técnica para que tengan un efecto mínimo en la actividad (véase, por ejemplo, Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)).

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.

Un "**receptor Fc activador**" es un receptor Fc que después de la ocupación por una región Fc de un anticuerpo provoca eventos de señalización que estimulan a células portadoras de receptores para llevar a cabo las funciones efectoras. Los receptores Fc activadores incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), y FcαRI (CD89). Un receptor Fc activador particular es FcγRIIIa humano (véase el número de referencia de UniProt P08637, versión 141).

La expresión "**miembro de la familia de ligandos de TNF**" o "ligando de la familia de TNF" se refiere a una citocina proinflamatoria. Las citocinas, en general, y

en particular los miembros de la familia de ligandos de TNF, desempeñan un papel crucial en la estimulación y coordinación del sistema inmunitario. Actualmente se han identificado diecinueve citocinas como miembros de la superfamilia de ligandos de TNF (factor de necrosis tumoral) basándose en similitudes de secuencia, funcionales, y estructurales. Todos estos ligandos son proteínas transmembrana de tipo II con un dominio extracelular C-terminal (ectodominio), dominio intracelular N-terminal y un solo dominio transmembrana. El dominio extracelular C-terminal, conocido como dominio de homología de TNF (THD), tiene un 20-30 % de identidad de aminoácidos entre los miembros de la superfamilia y es responsable de la unión al receptor. El ectodominio de TNF también es responsable de que los ligandos de TNF formen complejos triméricos que son reconocidos por sus receptores específicos.

Los miembros de la familia de ligandos de TNF se seleccionan entre el grupo que consiste en linfotoxina α (también conocida como LTA o TNFSF1), TNF (también conocido como TNFSF2), LT (también conocido como TNFSF3), OX40L (también conocido como TNFSF4), CD40L (también conocido como CD154 o TNFSF5), FasL (también conocido como CD95L, CD178 o TNFSF6), CD27L (también conocido como CD70 o TNFSF7), CD30L (también conocido como CD153 o TNFSF8), 4-1BBL (también conocido como TNFSF9), TRAIL (también conocido como APO2L, CD253 o TNFSF10), RANKL (también conocido como CD254 o TNFSF11), TWEAK (también conocido como TNFSF12), APRIL (también conocido como CD256 o TNFSF13), BAFF (también conocido como CD257 o TNFSF13B), LIGHT (también conocido como CD258 o TNFSF14), TL1A (también conocido como VEGI o TNFSF15), GITRL (también conocido como TNFSF18), EDA-A1 (también conocido como ectodisplasina A1) y EDA-A2 (también conocido como ectodisplasina A2). La expresión se refiere a cualquier ligando nativo de la familia de TNF de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En realizaciones específicas de la invención, el miembro de la familia de ligandos de TNF se selecciona entre el grupo que consiste en OX40L, FasL, CD27L, TRAIL, 4-1BBL, CD40L y GITRL. En una realización particular, el miembro de la familia de ligando de TNF se selecciona entre 4-1BBL y OX40L.

Puede encontrarse información adicional, en particular de secuencias, de miembros de la familia de ligandos de TNF a través de bases de datos de acceso

público, tales como Uniprot (www.uniprot.org). Por ejemplo, los ligandos de TNF tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: linfotoxina α humana (n.º de referencia de UniProt P01374, SEC ID Nº: 34), TNF humano (n.º de referencia de UniProt P01375, SEC ID Nº: 35), linfotoxina β humana (n.º de referencia de UniProt Q06643, SEC ID Nº: 36), OX40L humano (n.º de referencia de UniProt P23510, SEC ID Nº: 37), CD40L humano (n.º de referencia de UniProt P29965, SEC ID Nº: 38), FasL humano (n.º de referencia de UniProt P48023, SEC ID Nº: 39), CD27L humano (n.º de referencia de UniProt P32970, SEC ID Nº: 40), CD30L humano (n.º de referencia de UniProt P32971, SEC ID Nº: 41), 4-1BBL (n.º de referencia de UniProt P41273, SEC ID Nº: 42), TRAIL (n.º de referencia de UniProt P50591, SEC ID Nº: 43), RANKL (n.º de referencia de UniProt O14788, SEC ID Nº: 44), TWEAK (n.º de referencia de UniProt O43508, SEC ID Nº: 45), APRIL (n.º de referencia de UniProt O75888, SEC ID Nº: 46), BAFF (n.º de referencia de UniProt Q9Y275, SEC ID Nº: 47), LIGHT (n.º de referencia de UniProt O43557, SEC ID Nº: 48), TL1A (n.º de referencia de UniProt O95150, SEC ID Nº: 49), GITRL (n.º de referencia de UniProt Q9UNG2, SEC ID Nº: 50) y ectodisplasina A (n.º de referencia de UniProt Q92838, SEC ID Nº: 51).

Un "**ectodominio**" es el dominio de una proteína de membrana que se extiende en el espacio extracelular (es decir, el espacio fuera de la célula diana). Los ectodominios son normalmente las partes de las proteínas que inician el contacto con las superficies, lo que da lugar a la transducción de señales. El ectodominio del miembro de la familia de ligandos de TNF, tal como se define en el presente documento, se refiere por lo tanto a la parte de la proteína de ligando de TNF que se extiende en el espacio extracelular (el dominio extracelular), pero también incluye partes o fragmentos más cortos del mismo que son responsables de la trimerización y la unión al correspondiente receptor de TNF. La expresión "ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo", por lo tanto, se refiere al dominio extracelular del miembro de la familia de ligandos de TNF que forma el dominio extracelular o a partes del mismo que siguen siendo capaces de unirse al receptor (dominio de unión a receptor).

La expresión "**miembro de la familia de ligandos de TNF coestimulador**" o "ligando de la familia de TNF coestimulador" se refiere a un subgrupo de miembros de la familia de ligandos de TNF, que son capaces de estimular conjuntamente la proliferación y la producción de citocinas de las células T. Estos ligandos de la familia de TNF pueden estimular conjuntamente las señales de TCR tras la interacción con sus correspondientes receptores de TNF y la interacción con sus receptores da lugar al reclutamiento de factores asociados con TNFR (TRAF), que

inician cascadas de señalización que dan como resultado la activación de células T. Los ligandos coestimuladores de la familia de TNF se seleccionan entre el grupo que consiste en 4-1BBL, OX40L, GITRL, CD70, CD30L y LIGHT, más en particular, el miembro de la familia de ligando de TNF coestimulador se selecciona entre 4-1BBL y OX40L.

Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, 4-1BBL es una proteína transmembrana de tipo II y un miembro de la familia de ligandos de TNF. Se ha descrito que 4-1BBL completo o de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 42 forma trímeros en la superficie de las células. La formación de trímeros se habilita mediante motivos específicos del ectodominio de 4-1BBL. Dichos motivos se denominan en el presente documento como "región de trimerización". Los aminoácidos 50-254 de la secuencia de 4-1BBL humano (SEC ID Nº: 52) forman el dominio extracelular de 4-1BBL, pero los fragmentos pares del mismo son capaces de formar trímeros. En realizaciones específicas de la invención, la expresión "ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID Nº: 4 (aminoácidos 52-254 de 4-1BBL humano), SEC ID Nº: 1 (aminoácidos 71-254 de 4-1BBL humano), SEC ID Nº: 3 (aminoácidos 80-254 de 4-1BBL humano) y SEC ID Nº: 2 (aminoácidos 85-254 de 4-1BBL humano) o un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID Nº: 96 (aminoácidos 71-248 de 4-1BBL humano), SEC ID Nº: 375 (aminoácidos 52-248 de 4-1BBL humano), SEC ID Nº: 374 (aminoácidos 80-248 de 4-1BBL humano) y SEC ID Nº: 373 (aminoácidos 85-248 de 4-1BBL humano), sino también otros fragmentos del ectodominio capaz de trimerización se encuentran incluidos en el presente documento.

Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, OX40L es otra proteína transmembrana de tipo II y un miembro adicional de la familia de ligandos de TNF. OX40L humano completo o de longitud completa tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 37. Los aminoácidos 51-183 de la secuencia de OX40L humano (SEC ID Nº: 53) forman el dominio extracelular de OX40L, pero los fragmentos pares del mismo son capaces de formar trímeros. En realizaciones específicas de la invención, la expresión "ectodominio de OX40L o un fragmento del mismo" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID Nº: 53 (aminoácidos 51-183 de OX40L humano) o SEC ID Nº: 54 (aminoácidos 52-183 de OX40L humano), sino también otros fragmentos del ectodominio capaz de trimerización se encuentran incluidos en el presente documento.

La expresión "**enlazador peptídico**" se refiere a un péptido que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2 a 20 aminoácidos. Los enlazadores peptídicos se conocen en la técnica o se describen en el presente documento. Los enlazadores peptídicos adecuados no inmunogénicos son, por ejemplo, los enlazadores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en los que "n" es generalmente un número entre 1 y 10, típicamente entre 1 y 4. en particular 2, es decir, los péptidos seleccionados entre el grupo que consiste en GGGGS (SEC ID Nº: 128), GGGGSGGGGS (SEC ID Nº: 13), SGGGGSGGGG (SEC ID Nº: 55) y GGGGSGGGGSGGGG (SEC ID Nº: 56), pero también incluyen las secuencias GSPGSSSSGS (SEC ID Nº: 57), GSGSGSGS (SEC ID Nº: 58), GSGSGNGS (SEC ID Nº: 59), GGSGSGSG (SEC ID Nº: 60), GGSGSG (SEC ID Nº: 61), GGSG (SEC ID Nº62), GGSGNGSG (SEC ID Nº: 63), GGNGSGSG (SEC ID Nº: 64) y GGNGSG (SEC ID Nº: 65). Los enlazadores peptídicos de interés particular son $(G4S)_1$ o GGGGS (SEC ID Nº: 128), $(G_4S)_2$ o GGGGSGGGGS (SEC ID Nº: 13) y GSPGSSSSGS (SEC ID Nº: 57), más en particular $(G_4S)_2$ o GGGGSGGGGS (SEC ID Nº: 13) y GSPGSSSSGS (SEC ID Nº: 57).

El término "**aminoácido**", tal como se usa en esta solicitud indica el grupo de carboxi α-aminoácidos de origen natural que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y), y valina (val, V).

Una "**proteína de fusión monocatenaria**", tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido monocatenario compuesto de uno o dos ectodominios de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado a parte de un resto de unión a antígeno o parte Fc. La fusión puede suceder enlazando directamente el aminoácido C-terminal del resto de unión a antígeno a través de un enlazador peptídico al aminoácido C o N-terminal del ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF.

Por "fusionado" o "conectado" se entiende que los componentes (por ejemplo, un polipéptido y un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF) están enlazados mediante enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más enlazadores peptídicos.

El "**porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos**" respecto de la secuencia de un polipéptido (o proteína) 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, SAWI 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.

En determinadas realizaciones, se contemplan "**variantes de secuencia de aminoácidos**" de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF. Las variantes de secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF pueden prepararse introduciendo modificaciones adecuadas en la secuencia nucleotídica que codifica las moléculas, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción, y sustitución se efectúa para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno. Los sitios de interés para mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y las regiones marco conservadas (FR). En la tabla B se proporcionan sustituciones conservativas bajo el encabezado "sustituciones preferidas" y se describen adicionalmente a continuación en referencia a las clases (1) a (6) de cadena de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en la molécula de interés y explorarse los productos respecto de una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno mantenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA B

Resto Original	**Sustituciones Ejemplares**	**Sustituciones Preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn

Resto Original	**Sustituciones Ejemplares**	**Sustituciones Preferidas**
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo a propiedades de cadena lateral común:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influencian la orientación de cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

La expresión "**variantes de secuencia de aminoácidos**" incluye variantes sustanciales en las que las sustituciones de aminoácidos se encuentran en uno o más restos de región hipervariable de una molécula de unión a antígeno progenitora (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante (o

variantes) resultante seleccionada para estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) en relación a la molécula de unión a antígeno progenitora y/o tendrán determinadas propiedades biológicas sustancialmente mantenidas de la molécula de unión a antígeno progenitora. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación de fagos, tales como aquellas descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más restos de HVR y las moléculas de unión a antígeno mutadas y variantes presentadas en fagos se exploran respecto de una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones pueden suceder dentro de una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad de la molécula de unión a antígeno para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas tal como se proporciona en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden usarse como diana para mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" tal como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) se identifican y sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse una estructura cristalina de una molécula de unión a antígeno para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos pueden usarse como diana o eliminarse como candidatos para sustitución. Las variantes pueden explorarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos simples o múltiples de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen a la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF con un resto metionilo N-terminal. Otras variantes insercionales de la molécula

incluyen la fusión al extremo N o C-terminal de un polipéptido que aumenta la semivida en suero de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF.

En determinadas realizaciones, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF se alteran para aumentar o disminuir el alcance hasta el que el anticuerpo se glucosila. Pueden obtenerse de manera conveniente variantes de glucosilación de las moléculas alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que se crean o eliminan uno o más sitios de glucosilación. En los casos donde la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de TNF comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido ramificado biantenario que está unido generalmente mediante un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como fucosa unida a un GlcNAc en el "brote" de la estructura de oligosacárido biantenaria. En algunas realizaciones, pueden efectuarse modificaciones del oligosacárido en la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para crear variantes con determinadas propiedades mejoradas. En un aspecto, se proporcionan variantes de moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas variantes de fucosilación pueden tener función ADCC mejorada, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º US 2003/0157108 (Presta, L.) o US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Las variantes adicionales de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF incluyen aquellas con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en las que se bisecciona un oligosacárido biantenario unido a la región Fc mediante GlcNAc. Dichas variantes pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada, véase, por ejemplo, el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); la patente de Estados Unidos n.º 6.602.684 (Umana et al.); y en el documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada y se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); en el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y en el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear **variantes diseñadas**

de cisteína de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, por ejemplo, “tioMAbs,” donde uno o más restos de la molécula se han sustituido por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se encuentran en sitios accesibles de la molécula. Mediante la sustitución de esos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan por tanto en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármacos o restos enlazantes de fármacos, para crear un inmunoconjugado. En determinadas realizaciones, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Las moléculas de unión a antígeno diseñadas de cisteína pueden generarse tal como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos Nº 7.521.541.

En determinados aspectos, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF proporcionadas en el presente documento pueden modificarse adicionalmente para que contengan restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y que están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden tener las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, de si el derivado de anticuerpo biespecífico se usará en una terapia en condiciones definidas, etc. En otro aspecto, se proporcionan conjugados de anticuerpo y restos no proteínicos que se pueden haber calentado selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005)

11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañen a células normales, pero que calienten el resto no proteínico a una temperatura a la cual las células cercanas al resto no proteínico del anticuerpo se eliminan.

En otro aspecto, pueden obtenerse inmunoconjugados de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF proporcionadas en el presente documento. Un "**inmunoconjugado**" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas, incluyendo pero sin limitación un agente citotóxico.

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.

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

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.

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 del 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 la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para frenar la progresión de una enfermedad.

El término "**cáncer**", tal como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCL), cáncer de pulmón de células broncoalveolares, cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR), cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula adrenal,

sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwanomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewing, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de células B (linfoma), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), tricoleucemia, leucemia mieloblástica crónica, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención

La invención proporciona nuevas moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF con propiedades particularmente ventajosas, tales como capacidad de producción, estabilidad, afinidad de unión, actividad biológica, eficacia de direccionamiento y toxicidad reducida.

En un primer aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,

en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del

mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y
(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse establemente.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en las que el miembro de la familia de ligandos de TNF coestimula la activación de células T humanas.

En otro aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, en la que los ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF son idénticos en todos los casos.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la reivindicación 1, que comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que

(i) el primer polipéptido contiene un dominio CH1 o CL y el segundo polipéptido contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos que están conectados entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido, o

(ii) el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 por un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido, o

(iii) el primer polipéptido contiene un dominio de VH-CL o VL-CH1 y el segundo polipéptido contiene un dominio de VL-CH1 o un dominio de VH-CL, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y a una VH o VL mediante un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento de los mismos conectado a través de un enlazador peptídico a la VL o VH de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF comprende un miembro de la familia de ligandos de TNF que coestimula la activación de células T humanas que se selecciona entre 4-1BBL y OX40L. Más en particular, el miembro de la familia de ligando de TNF es 4-1BBL.

En otro aspecto, en la que el ectodominio de un miembro de la familia de

ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 373, SEC ID Nº: 374 y SEC ID Nº: 375, en particular la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 1 o SEC ID Nº: 96. En un aspecto, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4 y SEC ID Nº: 96, en particular la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 1 o SEC ID Nº: 96. En un aspecto particular, el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 96.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 97, SEC ID Nº: 98 y SEC ID Nº: 99 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 3 y SEC ID Nº: 4. En un aspecto particular, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 97 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 96.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 6.

En un aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 183.

En otro aspecto adicional, la molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 97 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 184 o SEC ID Nº: 185.

En otro aspecto, el miembro de la familia de ligando de TNF es OX40L. En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el ectodominio de un miembro de la familia de ligandos de TNF comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 53 o SEC ID Nº: 54, en particular la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 53.

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF que comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 371 o SEC ID Nº: 372 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 53 o SEC ID Nº: 54, respectivamente.

En un aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene el trímero de ligando de la familia de TNF de la invención comprende (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,

(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 o CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL o CH1, respectivamente, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,
y en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o los fragmentos del mismo que se conectan entre sí y al dominio CH1 o CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al dominio CL o CH1 de dicho polipéptido.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,
(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CH1 y un segundo polipéptido que contiene un dominio CL, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,
y en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que se conectan entre sí y al dominio CH1 mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado mediante un enlazador peptídico al dominio CL de dicho polipéptido.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,
(b) un primer polipéptido que contiene un dominio CL y un segundo polipéptido que contiene un dominio CH1, en la que el segundo polipéptido está unido al primer polipéptido mediante un enlace disulfuro entre el dominio CH1 y CL,
y en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que se conectan entre sí y al dominio CL mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo

conectado mediante un enlazador peptídico al dominio CH1 de dicho polipéptido.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) más de un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico a dicho polipéptido.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 por un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido. En particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contienen un trímero de ligando de la familia de TNF que comprende (a) dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana y (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro,

en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo,

en la que los dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana se unen a dos antígenos de célula diana diferentes.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una proteína de unión a antígeno de armazón.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana se selecciona del grupo que consiste en un fragmento de anticuerpo, una molécula Fab, una molécula Fab sobrecruzada, una molécula Fab

monocatenaria, una molécula Fv, una molécula scFv, un anticuerpo de un solo dominio, una VH y una proteína de unión a antígeno de armazón. En un aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una proteína de unión a antígeno de VH o de armazón. En un aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una proteína de unión a antígeno de armazón capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

En particular, la molécula de unión a antígeno que contiene el trímero de ligando de la familia de TNF comprende uno o dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una molécula Fab o una molécula Fab sobrecruzada capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana. En particular, el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es un Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

Además, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito en el presente documento, en la que el antígeno de célula diana se selecciona entre el grupo que consiste en proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD19, CD20 y CD33.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención, en la que un péptido que un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CH1 de una cadena pesada mediante un segundo enlazador peptídico y en la que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CL en una cadena ligera mediante un tercer enlazador peptídico.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención, en la que un péptido que un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CL de

una cadena pesada mediante un segundo enlazador peptídico y en la que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CH1 en una cadena ligera mediante un tercer enlazador peptídico.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF de acuerdo con la invención, en la que un péptido que un péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí por un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CL de una cadena ligera mediante un segundo enlazador peptídico y en la que un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal al dominio CH1 de la cadena pesada mediante un tercer enlazador peptídico.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de familia de TNF tal como se ha descrito anteriormente, en la que el enlazador peptídico es $(G4S)_2$. En un aspecto, el primer enlazador peptídico es $(G4S)_2$ (SEC ID Nº: 13), el segundo enlazador peptídico es GSPGSSSSGS (SEC ID Nº: 57) y el tercer enlazador peptídico es $(G4S)_2$ (SEC ID Nº: 13). En particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de TNF tal como se ha descrito anteriormente, en la que el primer enlazador peptídico es $(G4S)_2$ (SEC ID Nº: 13), el segundo enlazador peptídico es $(G4S)_2$ (SEC ID Nº: 13), y el tercer enlazador peptídico es $(G4S)_2$ (SEC ID Nº: 13).

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociación estable.

En particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF de la invención comprende (a) una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, en la que la cadena pesada de Fab se fusiona en el extremo C-terminal al extremo N-terminal de un dominio CH2 en el dominio Fc y (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaces de asociación estable.

En un aspecto adicional, el dominio Fc es una IgG, particularmente un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. Más en particular, el dominio Fc es un dominio

Fc de IgG1. En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc.

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

El dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligando de TNF de la invención consisten 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.

El dominio Fc confiere propiedades farmacocinéticas favorables a las moléculas de unión a antígeno de la invención, 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, dar lugar a un direccionamiento no deseado de los anticuerpos de la invención a células que expresan receptores de Fc en vez de a las células portadoras de antígeno preferidas. Por consiguiente, en aspectos particulares, el dominio de Fc la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF de la invención muestra una afinidad reducida a un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG_1 nativo. En un aspecto, el Fc no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o no induce función efectora. En un aspecto particular el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En un aspecto, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un aspecto específico, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ activador humano, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. En un aspecto, el dominio Fc no induce función efectora. 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, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos T reducido.

En determinados aspectos, pueden introducirse una o más modificaciones en la región Fc de una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF proporcionada en el presente documento, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana,
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y
(c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse establemente, en la que el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc, en particular hacia un receptor Fcγ.

En un aspecto, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen 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 particular, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácidos en una posición de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeración EU). En particular, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de IgG. Más en particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención que comprende un dominio Fc con las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (“P329G LALA”, numeración EU) en las cadenas pesadas de IgG. Las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A se refieren a la mutación denominada LALA. La combinación de sustituciones de aminoácidos "**P329G LALA**" suprime prácticamente por completo la unión a

receptor de Fcγ de un dominio Fc de IgG1 humana y se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2012/130831 que también describe métodos para preparar dichos dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como unión a receptor Fc o funciones efectoras. La "numeración EU" se refiere a la numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

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).

En otro aspecto, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4. Los anticuerpos de IgG4 muestran afinidad de unión reducida a los receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos de IgG1. En un aspecto más específico, 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. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende las sustituciones de aminoácidos L235E y S228P y P329G (numeración EU). Dichos mutantes de dominio Fc de IgG4 y sus propiedades de unión a receptor de Fcγ se describen también en el documento WO 2012/130831,

Los dominios Fc mutantes pueden prepararse mediante eliminación, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos 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 anticuerpos biespecíficos de la invención que comprenden un dominio Fc, puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. En el presente documento se describe un ensayo adecuado para medir la ADCC. Los 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 n.º 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 radioactivo 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 se puede evaluar *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 los anticuerpos biespecíficos de la invención son capaces 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)).

En un aspecto particular, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidad del dominio Fc.

Modificaciones de dominio Fc que promueven la heterodimerización

En un aspecto, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de

ligando de la familia de TNF de la invención comprenden (a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, (b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,

en la que la molécula se caracteriza por que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y por que el segundo polipéptido comprende solo un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo, y (c) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad capaz de asociarse establemente, en la que el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reduce la unión a un receptor de Fc, en particular hacia un receptor Fcγ. Por lo tanto, comprenden distintos restos, fusionados a una o a la otra de las dos subunidades del dominio Fc que están típicamente comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas ("cadenas pesadas"). 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 que contienen trímero de ligando de la familia de TNF en producción recombinante, será ventajoso por lo tanto introducir en el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

Por consiguiente, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligando de TNF de 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, dicha modificación se encuentra particularmente en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un aspecto específico, 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. Por lo tanto, en un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento que comprende una molécula de IgG, en la que la parte Fc de la primera cadena pesada comprende un primer módulo de dimerización y la parte Fc de la segunda cadena

pesada comprende un segundo módulo de dimerización que permite una heterodimerización de las dos cadenas pesadas de la molécula de IgG y el segundo módulo de dimerización comprende agujeros de acuerdo con la tecnología de pomos en agujeros.

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 un aspecto particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención se reemplaza un resto de aminoácido con un resto de aminoácido que tenga un mayor volumen de cadena lateral, 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 un aspecto específico, 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). Más en particular, 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). Más en particular, 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. El puente disulfuro estabiliza adicionalmente al dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En un aspecto alternativo, 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 en los dominios CH1/CL

Para mejorar adicionalmente el emparejamiento correcto, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligandos de TNF pueden contener diferentes sustituciones de aminoácidos cargados (denominados "restos cargados"). Estas modificaciones se introducen en los dominios CH1 y CL cruzados o no cruzados. En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF, en la que en uno de los dominios CL, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K) y en la que en uno de los dominios CH1 los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).

Más en particular, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF, en la que en el dominio CL adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K), y en la que en el dominio CH1 adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración

EU) se han sustituido por ácido glutámico (E).

Moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligandos de TNF particulares

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, un primer péptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí por un primer enlazador peptídico fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a una segunda cadena pesada o ligera, y un segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a una segunda cadena ligera o pesada, respectivamente.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el primer polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligando de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CL que es parte de una cadena ligera.

En otro aspecto más, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el primer polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligando de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CL que es parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CH1 que es parte de una cadena ligera.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que

contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el primer polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligando de TNF o fragmentos del mismo conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico se fusiona en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio VH que es parte de una cadena pesada, y el segundo péptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo se fusiona en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio VL que es parte de una cadena ligera.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de las reivindicaciones 21 a 23, en la que en el dominio CL adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se ha reemplazado por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se ha sustituido por lisina (K), y en la que en el dominio CH1 adyacente al miembro de la familia de ligandos de TNF, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se han sustituido por ácido glutámico (E). Estas modificaciones dan lugar a los denominados restos cargados con propiedades ventajosas que evitan efectos no deseados, tales como, por ejemplo, mal emparejamiento.

Además, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito en el presente documento, en la que el antígeno de célula diana se selecciona entre el grupo que consiste en proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD19, CD20 y CD33.

Moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligandos de TNF, en las que el antígeno de célula diana es CD19

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el antígeno de célula diana es CD19.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el resto capaz de unirse

específicamente a CD19 comprende un dominio VH que comprende (i) la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 195 o SEC ID Nº: 252, (ii) la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N: 196 o SEC ID Nº: 253, y (iii) la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 197 o SEC ID Nº: 254, y un dominio VL que comprende (iv) la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 198 o SEC ID Nº: 249, (v) la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 199 o SEC ID Nº: 250, y (vi) la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 200 o SEC ID Nº: 251.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD19 y comprende un dominio VH que comprende (i) la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 195, (ii) la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 196 y (iii) la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 197, y un dominio VL que comprende (iv) la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 198, (v) la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 199 y (vi) la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 200.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CD19 y comprende un dominio VH que comprende (i) la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 252, (ii) la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 253 y (iii) la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 254, y un dominio VL que comprende (iv) la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 249, (v) la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 250 y (vi) la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 251.

En otro aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al

menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202.

En un aspecto adicional, el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358.

En un aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202 o en la que el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358.

En un aspecto particular, el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202. En otro aspecto particular, el resto capaz de unirse específicamente a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 97, SEC ID Nº: 98 y SEC ID Nº: 99 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre

el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 3 y SEC ID Nº: 4.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 97 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 96.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 97, SEC ID Nº: 98 y SEC ID Nº: 99 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 3 y SEC ID Nº: 4.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 97 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 96.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende
una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, una segunda cadena pesada que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico que está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CH1, y una segunda cadena ligera que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CL, y en la que la molécula de unión a antígeno comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202 o
una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358,
(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 108, SEC ID Nº: 111 y SEC ID Nº: 113, y
(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 109, SEC ID Nº: 110, SEC ID Nº: 112 y SEC ID Nº: 114.

En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, y en la que la molécula de unión a antígeno comprende
una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, una segunda cadena pesada que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CL, y una segunda cadena ligera que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está fusionado en su extremo C-terminal

mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CH1, y en la que la molécula comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 201 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 202 o

una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358,

(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 115, SEC ID Nº: 117, SEC ID Nº: 119 y SEC ID Nº: 173, y

(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 116, SEC ID Nº: 118, SEC ID Nº: 120 y SEC ID Nº: 174.

Además, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende

(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y

(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,

en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 por un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

Más particularmente, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende

(i) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 209, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 210, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, o
(ii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 213, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 214, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, o
(iii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 309, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 310, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 279, o
(iv) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 313, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 314, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 279.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF, seleccionado entre el grupo que consiste en:

a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 115 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 116;

b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 117 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 118;

c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº. 206, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 209 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 210;

d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 205, una primera cadena ligera que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 120;

e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 173 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 174; y

f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº. 206, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 213 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 214.

En particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 205, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 206, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 119 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 120.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF, seleccionado entre el grupo que consiste en:

a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 115 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 116;

b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 117 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 118;

c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº. 358, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 209 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 210;

d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 120;

e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 173 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 174; y

f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº. 358, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 213 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 214.

En particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 357, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 358, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 119 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 120.

Moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de la familia de ligandos de TNF, en las que el antígeno de célula diana es CEA

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el antígeno de célula diana es CEA.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el resto capaz de unirse

específicamente a CEA comprende un dominio VH que comprende (i) la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 321, (ii) la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 322, y (iii) la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 323, y un dominio VL que comprende (iv) la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 324, (v) la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 325, y (vi) la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 326.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, en la que el resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana es una molécula Fab capaz de unirse específicamente a CEA y comprende un dominio VH que comprende (i) la CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 321, (ii) la CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 322 y (iii) la CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 323, y un dominio VL que comprende (iv) la CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 324, (v) la CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 325 y (vi) la CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 326.

En un aspecto adicional, el resto capaz de unirse específicamente a CEA comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 327 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 328.

En un aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a CEA comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 327 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 328.

En un aspecto adicional, el resto capaz de unirse específicamente a CEA comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330.

En un aspecto, el resto capaz de unirse específicamente a CEA comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 97, SEC ID Nº: 98 y SEC ID Nº: 99 y por que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 96, SEC ID Nº: 3 y SEC ID Nº: 4.

En un aspecto particular, la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 97 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 96.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que la molécula de unión a antígeno comprende
una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, una segunda cadena pesada que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí

mediante un primer enlazador peptídico que está fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CH1, y una segunda cadena ligera que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CL, y en la que la molécula de unión a antígeno comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330,
(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 108, SEC ID Nº: 111 y SEC ID Nº: 113, y
(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 109, SEC ID Nº: 110, SEC ID Nº: 112 y SEC ID Nº: 114.

En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, y en la que la molécula de unión a antígeno comprende
una primera cadena pesada y una primera cadena ligera, comprendiendo ambas una molécula Fab capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, una segunda cadena pesada que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos de los mismos conectados entre sí mediante un primer enlazador peptídico fusionado en su extremo C-terminal mediante un segundo enlazador peptídico a un dominio CL, y una segunda cadena ligera que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo que está fusionado en su extremo C-terminal mediante un tercer enlazador peptídico a un dominio CH1, y en la que la molécula comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende el dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 329 y una primera cadena ligera que comprende el dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 330,
(ii) una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 115, SEC ID Nº: 117, SEC ID Nº: 119 y SEC ID Nº: 173, y
(iii) una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 116, SEC ID Nº: 118, SEC

ID Nº: 120 y SEC ID Nº: 174.

Además, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, que comprende
(a) al menos un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, y
(b) un primer y un segundo polipéptido que están unidos entre sí por un enlace disulfuro,
en la que la molécula de unión a antígeno se caracteriza por que el primer polipéptido contiene un dominio CH3 y el segundo polipéptido contiene un dominio CH3, respectivamente, y en la que el primer polipéptido comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo que están conectados entre sí y al extremo C-terminal del dominio CH3 por un enlazador peptídico y en la que el segundo polipéptido comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo conectado a través de un enlazador peptídico al extremo C-terminal del dominio CH3 de dicho polipéptido.

En un aspecto particular, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende dos restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana.

Más particularmente, dicha molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF comprende
(i) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 337, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 338, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334, o
(ii) una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 341, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 342, y dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de la familia de ligando de TNF, seleccionado entre el grupo que consiste en:

a) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 333, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 115 y una

segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 116;

b) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 333, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 117 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 118;

c) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº. 334, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 337 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 338;

d) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 333, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 119 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 120;

e) una molécula que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 333, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 173 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 174; y

f) una molécula que comprende dos cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº. 334, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 341 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 342.

En particular, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF que comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 333, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 334, que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 119 y una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 120.

Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican a una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF tal como se ha descrito en el presente documento o un fragmento de la misma.

Los polinucleótidos aislados que codifican moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención pueden expresarse como un solo nucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno completa o como 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, de enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno funcional. Por ejemplo, la porción de cadena ligera de una inmunoglobulina puede codificarse por un polinucleótido separado a partir de la porción de cadena pesada de la inmunoglobulina. Cuando se expresan de manera conjunta, los polipéptidos de cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de cadena ligera para formar la inmunoglobulina.

En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF completa de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en el presente documento. En particular, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en el presente documento.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF, en la que el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí a través de un enlazador peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de 4-1BB, en la que el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, (b) una secuencia que codifica un

polipéptido que comprende dos ectodominios de 4-1BBL o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de 4-1BBL o un fragmento del mismo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos fragmentos de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4 o SEC ID Nº: 96, y a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de 4-1BBL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4 o SEC ID Nº: 96.

Además, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de OX40, en la que el polinucleótido comprende (a) una secuencia que codifica un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno de célula diana, (b) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos ectodominios de OX40L o dos fragmentos del mismo que están conectados entre sí mediante un enlazador peptídico y (c) una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un ectodominio de OX40L o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende dos fragmentos de 4-1BBL que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº: 53 o SEC ID Nº: 54, y a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de 4-1BBL que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº: 53 o SEC ID Nº: 54.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a polinucleótidos que comprenden una secuencia que es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 98 % o 100 % idéntica a las secuencias de ADNc específicas divulgadas en el presente documento. En un aspecto particular, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia que es idéntica a una de las secuencias de ADNc

específicas divulgadas en el presente documento.

En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID Nº: 5, 6, 97, 98, 99, 183, 184 o 185. En un aspecto adicional, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una cualquiera de las SEC ID Nº: 14, 15, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115.116, 117, 118, 119, 120, 173 o 174.

En otros aspectos más, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia nucleotídica seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID Nº: 66, 67, 68, 69, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 162, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 203, 204, 207, 208, 211, 212, 215, 216, 273, 274, 277, 278, 281, 282, 285, 286, 289, 290, 293, 294, 297, 298, 301, 302, 305, 307, 308, 311, 312, 315, 316, 331, 332, 335, 336, 339, 340, 343, 344, 347, 348, 353 o 354.

En determinados aspectos, 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

Pueden obtenerse moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF de la invención, 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 que contiene trímero de la familia de ligandos de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma, por ejemplo, tal como se han descrito anteriormente, se aísla e inserta 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 un aspecto de la invención, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Pueden usarse métodos conocidos para un experto en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de la molécula (o fragmento) de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF 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 que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o 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, bien fusionadas o no fusionadas a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma, o variantes o derivados 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 que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o de fragmentos de la misma, puede situarse el ADN que codifica una secuencia de señal cadena arriba del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos 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, se usa el péptido de señal nativo, por ejemplo, un péptido de señal de cadena pesada o de 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 la purificación posterior (por ejemplo, un marcador de histidina) o asistir en el marcado de la proteína de fusión dentro o en los extremos del polinucleótido que codifica una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma.

En un aspecto adicional de la invención, 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 un aspecto, 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 que contiene trímero de ligando de la familia de TNF 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 proteínas de

fusión 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 se conocen bien en la técnica. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según sea necesario 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 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 una inmunoglobulina, pueden modificarse por ingeniería genética para también expresar la otra de las cadenas de inmunoglobulina de tal forma que el producto expresado es una inmunoglobulina que tiene tanto una cadena ligera como una cadena pesada.

En un aspecto, se proporciona un método para producir una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos polipeptídicos de la misma, comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora que comprende polinucleótidos que codifican la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma, tal como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma, y recuperar la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención o fragmentos polipeptídicos de la misma de la célula hospedadora (o medio de cultivo de la célula hospedadora).

En la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención, los componentes (al menos un resto capaz de unirse

específicamente a un antígeno de célula diana, un polipéptido que comprende dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo y un polipéptido que comprende un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligandos de TNF o un fragmento del mismo) no están fusionados genéticamente entre sí. Los polipéptidos se diseñan de tal forma que sus componentes (dos ectodominios de un miembro de la familia de ligandos de TNF o fragmentos del mismo y otros componentes, tales como CH o CL) se fusionan entre sí directamente 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 de la invención 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 proteína de fusión si se desea, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de endopeptidasa.

En determinadas realizaciones, los restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) que forman parte de la molécula de unión a antígeno comprenden al menos una región variable de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno. 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 Nº 5.969.108 de McCafferty).

Pueden usarse inmunoglobulinas de cualquier especie animal en la invención. Las inmunoglobulinas no limitantes útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, de primate, o de ser humano. Si la proteína de fusión está prevista para su uso en seres humanos, puede usarse una forma quimérica de la inmunoglobulina en la que las regiones constantes de la inmunoglobulina son de un humano. Una forma humanizada o completamente humana de la inmunoglobulina 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). Las inmunoglobulinas particulares de acuerdo con la invención son inmunoglobulinas humanas. 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 determinados aspectos, los restos capaces de unirse específicamente a un antígeno de célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) comprendidos en las moléculas de unión a antígeno de la presente invención están modificadas por ingeniería genética para que tengan afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos en la publicación PCT WO 2012/020006 (véanse los Ejemplos relacionados con la maduración de afinidad) o la Solicitud Publicada de Patente de los Estados Unidos Nº 2004/0132066. La capacidad de las moléculas de unión a antígeno 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 (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 una molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo de referencia por la unión a un antígeno particular. En determinadas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno competidora se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) que está unido por la molécula de unión a antígeno de referencia. Los métodos ejemplares detallados para mapear un epítopo al que se une una molécula de unión a antígeno 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 en una solución que comprende una primera molécula de unión a antígeno marcada que se une al antígeno a una segunda molécula de unión a antígeno no marcada que se está ensayando respecto de su capacidad para competir con la primera molécula de unión a antígeno por la unión al antígeno. La segunda molécula de unión a antígeno puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba antígeno inmovilizado en una solución que comprende la primera molécula de unión a antígeno marcada pero no la segunda molécula de unión a antígeno no marcada. 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, entonces esto indica que la segunda molécula de unión a antígeno está compitiendo con la primera molécula de unión a antígeno 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 que contienen trímero de ligando de TNF de la invención 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 que contiene trímero de ligando de la familia de TNF. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas de fusión 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 esencialmente como se describe en los ejemplos. Puede determinarse la pureza de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF o fragmentos de la misma mediante cualquiera de una diversidad de métodos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis en gel, cromatografía líquida de alta presión, y similares. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de TNF expresadas tal como se describe en los ejemplos demostraron estar intactas y ensambladas correctamente, tal como se demostró mediante SDS-PAGE reductora y no reductora.

Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno 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.

1. Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF proporcionada en el presente documento por el correspondiente receptor de TNF puede determinarse 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. La afinidad de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF por el antígeno de célula diana también puede determinarse 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. Una realización ilustrativa específica y ejemplar para medir la afinidad de unión se describe en el ejemplo 4. De acuerdo con un aspecto, la K_D se mide mediante resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

2. Ensayos de unión y otros ensayos

La unión de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF proporcionada en el presente documento a las correspondientes células que expresan receptor puede evaluarse usando líneas celulares que expresan el receptor particular o antígeno diana, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). En un aspecto, se usan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que expresan el receptor de TNF en el ensayo de unión. Estas células se usan directamente después de su aislamiento (PBMC no expuestos previamente) o después de su activación (PBMC activados). En otro aspecto, se usaron esplenocitos activados de ratón (que expresan la molécula receptora de TNF) para demostrar la unión de la molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención a las correspondientes células que expresan receptor de TNF.

En un aspecto adicional, se usaron líneas celulares de cáncer que expresan el antígeno de célula diana, para demostrar la unión de las moléculas de unión a antígeno al antígeno de célula diana.

En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar una molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo específico o molécula de unión a antígeno por la unión a la diana o receptor de TNF, respectivamente. En determinadas realizaciones, dicha molécula de unión a antígeno competidora se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) que se une mediante un anticuerpo específico anti-diana o un anticuerpo específico anti-receptor de TNF. 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).

3. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF que se unen a una diana específica y a un receptor de TNF específico que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, señalización agonista a través del receptor de TNF en células que expresan el antígeno de célula diana. También se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF en las que se identifica mediante los ensayos que tienen dicha actividad *in vitro*.

En determinados aspectos, se ensaya una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención respecto de dicha actividad biológica. Los ensayos para detectar la actividad biológica de las moléculas de la invención son aquellos descritos en el ejemplo 6. Además, se conocen bien en la técnica ensayos para detectar la lisis celular (por ejemplo, mediante la medición de la liberación de LDH), la cinética de la apoptosis inducida (por ejemplo, mediante la medición de la actividad de caspasa 3/7) o la apoptosis (por ejemplo, usando el ensayo TUNEL). Además, la actividad biológica de dichos complejos puede determinarse evaluando sus efectos en la supervivencia, proliferación y secreción de linfocinas de diversos subconjuntos de linfocitos, tales como células NK, células NKT o células T γδ□o evaluando su capacidad para modular el fenotipo y función las células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas□□los monocitos/macrófagos o las células B.

Composiciones farmacéuticas Formulaciones y rutas de administración

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF 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 que contienen trímero de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero

de ligando de la familia de TNF proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de *unión* a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF disueltas o dispersadas en un excipiente 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 que contiene trímero de ligando de la familia de TNF 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. En particular, las composiciones son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Tal como se usa en el presente documento, un "excipiente 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, sales, estabilizantes y combinaciones de los mismos, como sabrá un experto habitual en la materia.

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 que contienen trímero de ligando de la familia de TNF 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 proteínas de fusión 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 proteínas de fusión 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 excipientes 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 aproximadamente10 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 carboximetilcelulsa 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.

Los excipientes ejemplares farmacéuticamente aceptables en el presente documento incluyen adicionalmente agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutros-activos solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinados sHASEGP y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos nº 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina un sHASEGP con uno o más gucosaminosacáridos adicionales, tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo ilustrativas se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpo incluyen aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos nº 6.171.586 y en el documento WO 2006/044908, estas últimas formulaciones incluyendo un tampón de histidina-acetato.

Además de las composiciones descritas anteriormente, también pueden formularse las proteínas de fusión 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 proteínas de fusión pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por

ejemplo, una sal muy poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión 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 que contienen trímero de ligando de la familia de TNF pueden formularse en una composición en forma de ácido 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.

La composición en el presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichos principios activos están presentes de manera adecuada en combinaciones en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son, generalmente, estériles. Puede lograrse fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Métodos terapéuticos y composiciones

Puede usarse en métodos terapéuticos cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF.

Para su uso en métodos terapéuticos, las moléculas de unión a antígeno que

contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención 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 que contienen trímero de ligando de la familia de TNF de la invención para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento de una enfermedad, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer. En determinados aspectos, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en un método de tratamiento. En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En determinados aspectos, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF 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 proteína de fusión. En determinados aspectos, la enfermedad que se va a tratar es cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen tumores sólidos, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, 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, melanoma, linfoma de linfocitos B, leucemia de células B, linfoma no de Hodgkin y leucemia linfoblástica aguda. Por lo tanto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento del cáncer. El sujeto, paciente o "individuo" que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento enfermedades infecciosas, en particular para el tratamiento de infecciones víricas. En un aspecto adicional, se proporciona una molécula de unión a antígeno que

contiene trímero de ligando de la familia de TNF para su uso en el tratamiento enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Lupus.

En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de mama, cáncer colorrectal (CCR), cáncer pancreático (PAC), cáncer gástrico, carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) y mesotelioma.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF pueden administrarse en combinación con otros uno o más agentes en terapia. Por ejemplo, una proteína de fusión de la invención puede administrarse de manera conjunta con al menos un agente terapéutico adicional. La expresión "agente terapéutico" abarca cualquier agente que pueda administrarse 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 otro agente anticáncer.

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 proteína de fusión empleada, del tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías 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 que contiene trímero de ligando de la familia de TNF de la invención puede suceder antes de, de manera simultánea, y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante.

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 que es perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno que contiene trímero de ligando de la familia de TNF 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 que contiene trímero de ligando de la familia de TNF 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.

Tabla C (secuencias):

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
1	(hu) 4-1BBL humano	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	(71-254)	LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
2	hu 4-1BBL (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSE
3	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
4	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSPRSE
5	hu 4-1BBL dimérico (71-254) conectado mediante el enlazador $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSE
6	hu 4-1BBL monomérico (71-254) más enlazador $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGG GGSGGGGS
13	$(G4S)_2$	GGGGSGGGGS
14	hu 4-1BBL dimérico(71-254)-Fc de CH1 cadena de pomo	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
15	hu 4-1BBL	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	monomérico (71-254)-CL	LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGG GGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
28	CEA humano	n.º de UniProt P06731
29	MCSP humano	n.º de UniProt Q6UVK1
30	EGFR humano	n.º de UniProt P00533
31	CD19 humano	n.º de UniProt P15391
32	CD20 humano	n.º de UniProt P11836
33	CD33 humano	n.º de UniProt P20138
34	Linfotoxina α humana	n.º de UniProt P01374
35	TNF humano	n.º de UniProt P01375
36	Linfotoxinaβ humana	n.º de UniProt Q06643
37	OX40L humano	n.º de UniProt P23510
38	CD40L humano	n.º de UniProt P29965
39	FasL humano	n.º de UniProt P48023
40	CD27L humano	n.º de UniProt P32970
41	CD30L humano	n.º de UniProt P32971
42	4-1BBL humano	n.º de UniProt P41273
43	TRAIL humano	n.º de UniProt P50591
44	RANKL humano	n.º de UniProt O14788
45	TWEAK humano	n.º de UniProt O43508
46	APRIL humano	n.º de UniProt O75888
47	BAFF humano	n.º de UniProt Q9Y275
48	LIGHT humano	n.º de UniProt O43557
49	TL1A humano	n.º de UniProt O95150
50	GITRL humano	n.º de UniProt Q9UNG2
51	ectodisplasina A humana	n.º de UniProt Q92838
52	hu 4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPD

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
53	hu OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKE DEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNI SLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYK DKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPG EFCVL
54	hu OX40L (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKED EIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNIS LHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKD KVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGE FCVL
55	Enlazador peptídico $(SG4)_2$	SGGGGSGGGG
56	Enlazador peptídico $G4(SG4)_2$	GGGGSGGGGSGGGG
57	Enlazador peptídico	GSPGSSSSGS
58	Enlazador peptídico $(G4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	Enlazador peptídico	GSGSGNGS
60	Enlazador peptídico	GGSGSGSG
61	Enlazador peptídico	GGSGSG
62	Enlazador peptídico	GGSG
63	Enlazador peptídico	GGSGNGSG
64	Enlazador peptídico	GGNGSGSG
65	Enlazador peptídico	GGNGSG
66	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico(71-254)-Fc de CH1 cadena de	Véase la Tabla 2

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	pomo	
67	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CL1	Véase la Tabla 2
70	(mu) 4-1BBL murino	n.º de UniProt Q3U1Z9-1
71	secuencia nucleotídica mu 4-1BBL dimérico (104-309, C137,160,246S)-Fc de CH1 cadena de pomo	Véase la Tabla 13
72	secuencia nucleotídica mu 4-1BBL monomérico (104-309, C137,160,246S)-CL	Véase la Tabla 13
75	mu 4-1BBL dimérico (104-309, C137,160,246S) – cadena DD de Fc de CL	Véase la Tabla 13
76	mu 4-1BBL monomérico (104-309, C137,160,246S)-CL1	Véase la Tabla 13
79	secuencia nucleotídica de cadena de Fc-agujero de DP47	Véase la Tabla 18
80	secuencia nucleotídica de	Véase la Tabla 18

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	cadena ligera de DP47	
81	cadena de Fc-agujero de DP47	Véase la Tabla 18
82	cadena ligera de DP47	Véase la Tabla 18
83	Fc(kih) de 4-1BB humano	Véase la Tabla 31
84	Fc(kih) de 4-1BB de cinomolgo	Véase la Tabla 31
85	Fc(kih) de 4-1BB murino	Véase la Tabla 31
86	secuencia nucleotídica cadena de agujero de Fc	Véase la Tabla 32
87	secuencia nucleotídica Fc(kih) de 4-1BB humano	Véase la Tabla 32
88	secuencia nucleotídica Fc(kih) de 4-1BB de cinomolgo	Véase la Tabla 32
89	secuencia nucleotídica Fc(kih) de 4-1BB murino	Véase la Tabla 32
90	cadena de agujero de Fc	Véase la Tabla 32
91	Fc(kih) de 4-1BB humano	Véase la Tabla 32
92	Fc(kih) de 4-1BB de cinomolgo	Véase la Tabla 32
93	Fc(kih) de 4-1BB	Véase la Tabla 32

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	murino	
94	secuencia nucleotídica 4-1BB His humano	Véase la Tabla 33
95	4-1BB His humano	Véase la Tabla 33
96	(hu) 4-1BBL humano (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
97	hu 4-1BBL dimérico (71-248) conectado mediante el enlazador $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
98	hu 4-1BBL dimérico (80-254) conectado mediante el enlazador $(G4S)_2$	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGS DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
99	hu 4-1BBL dimérico (52-254) conectado mediante el enlazador $(G4S)_2$	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSP WAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLG LFRVTPEIPAGLPSPRSE
108	hu 4-1BBL dimérico(71-254)-CH1 *Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 4
109	hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CL*	véase la Tabla 4
110	hu 4-1BBL monomérico (71-254)-(G4S)1-CL*	véase la Tabla 7
111	hu 4-1BBL dimérico(52-254)-CH1 *Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 10
112	hu 4-1BBL monomérico (52-254)-CL*	véase la Tabla 10
113	hu 4-1BBL dimérico(80-254)-CH1 *Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 11

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
114	hu 4-1BBL monomérico (80-254)-CL*	véase la Tabla 11
115	hu 4-1BBL dimérico(71-254)-CL *Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
116	hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CH1*	véase la Tabla 3
117	hu 4-1BBL dimérico(71-254)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 22
118	hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CH1	véase la Tabla 22
119	hu 4-1BBL dimérico(71-248)-CL *Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 24
120	hu 4-1BBL monomérico (71-248)-CH1*	véase la Tabla 24
128	Enlazador peptídico	GGGGS
129	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
130	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CH1*	véase la Tabla 3
131	secuencia	véase la Tabla 4

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CH1* Fc de cadena de pomo	
132	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CL*	véase la Tabla 4
137	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CH1* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 5
138	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL*	véase la Tabla 5
139	hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 5
140	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL*	véase la Tabla 5
143	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254) –$(G4S)_1$- CL*	véase la Tabla 7
150	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (52-254)-CH1* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 10
151	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico	véase la Tabla 10

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	(52-254) –CL*	
152	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (80-254)-CH1* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 11
153	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (80-254) –CL*	véase la Tabla 11
154	secuencia nucleotídica cadena KK de Fc de DP47	véase la Tabla 14
155	secuencia nucleotídica de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 14
156	cadena KK de Fc de DP47	véase la Tabla 14
157	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 14
158	secuencia nucleotídica mu 4-1BBL dimérico (104-309, C160S) – cadena DD de Fc de CL	véase la Tabla 15
159	secuencia nucleotídica 4-1BBL murino monomérico (104-309, C160S) – CH1	véase la Tabla 15
160	mu 4-1BBL dimérico (104-309, C160S) – cadena DD de Fc de CL	véase la Tabla 15

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
161	4-1BBL murino monomérico (104-309, C160S) – CH1	véase la Tabla 15
165	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 22
166	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CH1	véase la Tabla 22
169	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-248)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 24
170	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 24
171	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-248)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 25
172	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 25
173	hu 4-1BBL dimérico (71-248)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 25

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
174	hu 4-1BBL (71-248)-CH1 monomérico	véase la Tabla 25
177	secuencia nucleotídica cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la Tabla 27
178	secuencia nucleotídica cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la Tabla 27
179	cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la Tabla 27
180	cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la Tabla 27
181	secuencia nucleotídica de cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	véase la Tabla 29
182	cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	véase la Tabla 29
183	hu 4-1BBL monomérico (71-254) más enlazador $(G4S)_1$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGG GGS
184	hu 4-1BBL monomérico (71-248) más enlazador $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGS
185	hu 4-1BBL monomérico (71-248) más enlazador $(G4S)_1$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGS
186	Secuencia nucleotídica cadena de Fc pomo de antígeno CD19 humano marcador avi	véase la Tabla 43
187	Secuencia polipeptídica cadena de Fc pomo de antígeno CD19 humano marcador avi	véase la Tabla 43
188	Secuencia nucleotídica cadena de Fc pomo de antígeno CD19 de cinomolgo marcador avi	véase la Tabla 43
189	Secuencia polipeptídica cadena de Fc pomo de	véase la Tabla 43

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	antígeno CD19 de cinomolgo marcador avi	
190	CD19 humanizado (8B8) HVR-L1	NSNGNT
191	CD19 humanizado (8B8) HVR-H2	KFNG
192	CD19 humanizado (8B8) var. 1 a 9 HVR-H2	TEKFQGRVTM
193	CD19 humanizado (8B8) var. 5 HVR-L1	LENPNGNT
194	CD19 humanizado (8B8) var. 9 HVR-L1	LENPSGNT
195	CD19 (8B8-018) CDR-H1	DYIMH
196	CD19 (8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
197	CD19 (8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
198	CD19 (8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
199	CD19 (8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS
200	CD19 (8B8-018) CDR-L3	LQLTHVPYT
201	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
202	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENP NGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QLTHVPYTFGQGTKLEIK
203	Secuencia	véase la Tabla 47

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	
204	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47
205	anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 47
206	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47
207	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	véase la Tabla 49
208	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 49
209	anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	véase la Tabla 49
210	anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 49
211	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico (71-248) de	véase la Tabla 52

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	Fc agujero	
212	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico (71-248) de Fc pomo	véase la Tabla 52
213	anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	véase la Tabla 52
214	anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico (71-248) de Fc pomo	véase la Tabla 52
215	Secuencia nucleotídica CD19 (8B8) VH clon progenitor	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGA GCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGAT GGCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAC TGACTATATTATGCACTGGGTGAAGCAGAA GACTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGAT ATATTAATCCTTACAATGATGGTTCTAAGTA CACTGAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACACT GACTTCAGACAAATCTTCCATCACAGCCTA CATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGG ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGA CCTATTATTATGGTAGCGCCCTCTTTGACTA CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCT CCTCG
216	Secuencia nucleotídica CD19 (8B8) VL clon progenitor	GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCC CTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAA AACAGTAATGGAAACACCTATTTGAACTGG TACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAA CTCCTGATCTACAGGGTTTCCAAACGATTTT CTGGGGTCCTAGACAGGTTCAGTGGTAGT GGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGT

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		TTATTTCTGCCTACAACTTACACATGTCCCG TACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGA AATAAAA
217	CD19 L1 inverso aleatorio	véase la Tabla 53
218	CD19 L3 directo aleatorio	véase la Tabla 53
219	CD19 H1 inverso aleatorio	véase la Tabla 53
220	CD19 H2 directo aleatorio	véase la Tabla 53
221	CD19 H3 inverso constante	véase la Tabla 53
222	LMB3	véase la Tabla 53
223	D19 L1 directo constante	véase la Tabla 54
224	CD19 L3 inverso aleatorio	véase la Tabla 54
225	CD19 L3 directo constante	véase la Tabla 54
226	CD19 H3 inverso aleatorio	véase la Tabla 54
227	Secuencia nucleotídica marcador SNAP ECD de CD19 humano- PDGFR	GGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAAGG ACGACGATGACAAGGCCGGCATCGATGCC ATCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCGC ACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGCAAGCT GGAACTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGC ACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAACA TCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTGC CCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGAGC CACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTCAAC GCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAG GAGTTCCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCC AGTGTTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCA GGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAA

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		GTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCAGCT GGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCA CCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGAGCGGA AATCCCGTGCCCATTCTGATCCCCTGCCAC CGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCGTGGG GGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAAAG AGTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACAGA CTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTGATATCCC CGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAG AGGGCGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTG AAGGGCACCTCCGATGGCCCTACCCAGCA GCTGACCTGGTCCAGAGAGAGCCCCCTGA AGCCCTTCCTGAAGCTGTCTCTGGGCCTGC CTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTCTG GCCATCTGGCTGTTCATCTTCAACGTGTCC CAGCAGATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCA GCCTGGCCCCCCATCTGAGAAGGCTTGGC AGCCTGGCTGGACCGTGAACGTGGAAGGA TCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTC CGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGA AGAACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGC CCCAGCGGCAAACTGATGAGCCCCAAGCT GTACGTGTGGGCCAAGGACAGACCCGAGA TCTGGGAGGGCGAGCCTCCTTGCCTGCCC CCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCTGAG CCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCA CACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCC GACTCTGTGTCTAGAGGCCCTCTGAGCTGG ACCCACGTGCACCCTAAGGGCCCTAAGAG CCTGCTGAGCCTGGAACTGAAGGACGACA GGCCCGCCAGAGATATGTGGGTCATGGAA ACCGGCCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGC CCAGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACA GAGGCAACCTGACCATGAGCTTCCACCTG GAAATCACCGCCAGACCCGTGCTGTGGCA

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		CTGGCTGCTGAGAACAGGCGGCTGGAAGG TCGACGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGG ATCTGAATGCTGTGGGCCAGGACACGCAG GAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCC TTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTG GCCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTT ATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAG CCACGT
228	Secuencia nucleotídica marcador SNAP ECD de CD19 de cinomolgo-PDGFR	CCGGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAA GGACGACGATGACAAGGCCGGCATCGATG CCATCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGC GCACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGCAAG CTGGAACTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCT GCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAA CATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCT GCCCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGA GCCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTCA ACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCG AGGAGTTCCCTGTGCCAGCCCTGCACCAC CCAGTGTTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGC CAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGT GAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGC AGCTGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCC GCCACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGAG CGGAAATCCCGTGCCCATTCTGATCCCCTG CCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCG TGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGT GAAAGAGTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCC ACAGACTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTGAT ATCCCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGT GGAAGAGGGCGACAATGCCGTGCTCCAGT GTCTCGAGGGCACCTCCGATGGCCCTACA CAGCAGCTCGTGTGGTGCAGAGACAGCCC CTTCGAGCCCTTCCTGAACCTGTCTCTGGG CCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCC

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		CTCTGGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACG TGTCCAACCAGACCGGCGGCTTCTACCTGT GTCAGCCTGGCCTGCCAAGCGAGAAGGCT TGGCAGCCTGGATGGACCGTGTCCGTGGA AGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACG TGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGC CTGAAGAACAGAAGCAGCGAGGGCCCTAG CAGCCCCAGCGGCAAGCTGAATAGCAGCC AGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACAGACCC GAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTGTGTGG CCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCCT GAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCA GCACACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCA CCCGACTCTGTGTCCAGAGGCCCTCTGAG CTGGACACACGTGCGGCCTAAGGGCCCTA AGAGCAGCCTGCTGAGCCTGGAACTGAAG GACGACCGGCCCGACCGGGATATGTGGGT GGTGGATACAGGCCTGCTGCTGACCAGAG CCACAGCCCAGGATGCCGGCAAGTACTAC TGCCACAGAGGCAACTGGACCAAGAGCTTT TACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGCCCT GTGGCACTGGCTGCTGAGAATCGGAGGCT GGAAGGTCGACGAGCAGAAGCTGATCTCC GAAGAGGACCTGAACGCCGTGGGCCAGGA TACCCAGGAAGTGATCGTGGTGCCCCACA GCCTGCCCTTCAAGGTGGTCGTGATCAGC GCCATTCTGGCCCTGGTGGTGCTGACCATC ATCAGCCTGATCATCCTGATTATGCTGTGG CAGAAAAAGCCCCGC
229	Secuencia polipeptídica marcador SNAP ECD de CD19 humano-PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKRT TLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAAD AVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAYFHQ PEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLLK VVKFGEVISYQQLAALAGNPAATAAVKTALSG NPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEGGLAVKEW

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		LLAHEGHRLGKPGLGDIPEEPLVVKVEEGDN AVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKL SLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYL CQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWN VSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPK LYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQ DLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTH VHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGL LLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITAR PVLWHWLLRTGGWKVDEQKLISEEDLNAVG QDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLII LIMLWQKKPR
230	Secuencia polipeptídica marcador SNAP ECD de CD19 de cinomolgo- PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKRT TLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAAD AVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAYFHQ PEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLLK VVKFGEVISYQQLAALAGNPAATAAVKTALSG NPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEGGLAVKEW LLAHEGHRLGKPGLGDIPQEPLVVKVEEGDN AVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRDSPFEPFLNL SLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGGFYL CQPGLPSEKAWQPGWTVSVEGSGELFRWN VSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQ LYVWAKDRPEMWEGEPVCGPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWT HVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDMWVVDT GLLLTRATAQDAGKYYCHRGNWTKSFYLEIT ARPALWHWLLRIGGWKVDEQKLISEEDLNAV GQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIIS LIILIMLWQKKPR
231	CD19 (8B8-5H09) CDR-L1	véase la Tabla 56
232	CD19 (8B8-5H09) CDR-L2	véase la Tabla 56

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
233	CD19 (8B8-5H09) CDR-L3	véase la Tabla 56
234	CD19 (8B8-5H09) CDR-H1	véase la Tabla 57
235	CD19 (8B8-5H09) CDR-H2	véase la Tabla 57
236	CD19 (8B8-5H09) CDR-H3	véase la Tabla 57
237	CD19 (8B8-7H07) CDR-L1	véase la Tabla 56
238	CD19 (8B8-7H07) CDR-L2	véase la Tabla 56
239	CD19 (8B8-7H07) CDR-L3	véase la Tabla 56
240	CD19 (8B8-7H07) CDR-H1	véase la Tabla 57
241	CD19 (8B8-7H07) CDR-H2	véase la Tabla 57
242	CD19 (8B8-7H07) CDR-H3	véase la Tabla 57
243	CD19 (8B8-2B03) CDR-L1	véase la Tabla 56
244	CD19 (8B8-2B03) CDR-L2	véase la Tabla 56
245	CD19 (8B8-2B03) CDR-L3	véase la Tabla 56
246	CD19 (8B8-2B03) CDR-H1	véase la Tabla 57
247	CD19 (8B8-2B03) CDR-H2	véase la Tabla 57
248	CD19 (8B8-2B03) CDR-H3	véase la Tabla 57
249	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	véase la Tabla 56
250	CD19 (8B8-2B11)	véase la Tabla 56

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	CDR-L2	
251	CD19 (8B8-2B11) CDR-L3	véase la Tabla 56
252	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	véase la Tabla 57
253	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	véase la Tabla 57
254	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	véase la Tabla 57
255	CD19 (8B8-5A07) CDR-L1	véase la Tabla 56
256	CD19 (8B8-5A07) CDR-L2	véase la Tabla 56
257	CD19 (8B8-5A07) CDR-L3	véase la Tabla 56
258	CD19 (8B8-5A07) CDR-H1	véase la Tabla 57
259	CD19 (8B8-5A07) CDR-H2	véase la Tabla 57
260	CD19 (8B8-5A07) CDR-H3	véase la Tabla 57
261	CD19 (8B8-5B08) CDR-L1	véase la Tabla 56
262	CD19 (8B8-5B08) CDR-L2	véase la Tabla 56
263	CD19 (8B8-5B08) CDR-L3	véase la Tabla 56
264	CD19 (8B8-5B08) CDR-H1	véase la Tabla 57
265	CD19 (8B8-5B08) CDR-H2	véase la Tabla 57
266	CD19 (8B8-5B08) CDR-H3	véase la Tabla 57
267	CD19 (8B8-5D08) CDR-L1	véase la Tabla 56

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
268	CD19 (8B8-5D08) CDR-L2	véase la Tabla 56
269	CD19 (8B8-5D08) CDR-L3	véase la Tabla 56
270	CD19 (8B8-5D08) CDR-H1	véase la Tabla 57
271	CD19 (8B8-5D08) CDR-H2	véase la Tabla 57
272	CD19 (8B8-5D08) CDR-H3	véase la Tabla 57
273	Secuencia nucleotídica CD19 (8B8) cadena ligera progenitora	véase la Tabla 58
274	Secuencia nucleotídica CD19 (8B8) cadena pesada progenitora	véase la Tabla 58
275	CD19 (8B8) cadena ligera progenitora	véase la Tabla 58
276	CD19 (8B8) cadena pesada progenitora	véase la Tabla 58
277	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59
278	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-2B11) cadena pesada	véase la Tabla 59
279	CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59
280	CD19(8B8-2B11) cadena pesada	véase la Tabla 59
281	secuencia	véase la Tabla 59

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	nucleotídica CD19 (8B8-7H07) cadena ligera	
282	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-7H07) cadena pesada	véase la Tabla 59
283	CD19(8B8-7H07) cadena ligera	véase la Tabla 59
284	CD19(8B8-7H07) cadena pesada	véase la Tabla 59
285	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-2B03) cadena ligera	véase la Tabla 59
286	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-2B03) cadena pesada	véase la Tabla 59
287	CD19(8B8-2B03) cadena ligera	véase la Tabla 59
288	CD19(8B8-2B03) cadena pesada	véase la Tabla 59
289	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5A07) cadena ligera	véase la Tabla 59
290	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5A07) cadena pesada	véase la Tabla 59
291	CD19(8B8-5A07) cadena ligera	véase la Tabla 59
292	CD19 (8B8-5A07) cadena pesada	véase la Tabla 59

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
293	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5D08) cadena ligera	véase la Tabla 59
294	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5D08) cadena pesada	véase la Tabla 59
295	CD19(8B8-5D08) cadena ligera	véase la Tabla 59
296	CD19(8B8-5D08) cadena pesada	véase la Tabla 59
297	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5B08) cadena ligera	véase la Tabla 59
298	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5B08) cadena pesada	véase la Tabla 59
299	CD19 (8B8-5B08) cadena ligera	véase la Tabla 59
300	CD19 (8B8-5B08) cadena pesada	véase la Tabla 59
301	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5H09) cadena ligera	véase la Tabla 59
302	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-5H09) cadena pesada	véase la Tabla 59
303	CD19(8B8-5H09) cadena ligera	véase la Tabla 59
304	CD19 (8B8-5H09)	véase la Tabla 59

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	cadena pesada	
305	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
306	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
307	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	véase la Tabla 64
308	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 64
309	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	véase la Tabla 64
310	anti-CD19(8B8-2B11) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 64
311	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	véase la Tabla 67
312	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11)	véase la Tabla 67

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	ligando monomérico (71-248) de Fc pomo	
313	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	véase la Tabla 67
314	anti-CD19(8B8-2B11) ligando monomérico (71-248) de Fc pomo	véase la Tabla 67
315	secuencia nucleotídica CD19(8B8-018) cadena pesada (huIgG1 PGLALA)	véase la Tabla 72
316	CD19(8B8-018) cadena pesada (huIgG1 PGLALA)	véase la Tabla 72
317	anti-mu CEA T84.66 VH	MKCSWVIFFL MAVVTGVNSE VQLQQSGAEL VEPGASVKLS CTASGFNIKD TYMHWVKQRP EQGLEWIGRI DPANGNSKYV PKFQGKATIT ADTSSNTAYL QLTSLTSEDT AVYYCAPFGY YVSDYAMAYW GQGTSVTVSS
318	anti-mu CEA T84.66 VL	METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT MSCRAGESVD IFGVGFLHWY QQKPGQPPKL LIYRASNLES GIPVRFSGTG SRTDFTLIID PVEADDVATY YCQQTNEDPY TFGGGTKLEI K
319	IGHV1-69*08 n.º de Ref. IMGT Z14309	TAAGGGGCTT CCTAGTCCTA AGGCTGAGGA AGGGATCCTG GTTTAGTTAA AGAGGATTTT ATTCACCCCT GTGTCCTCTC CACAGGTGTC CAGTCCCAGG TCCAGCTGGT GCAATCTGGG GCTGAGGTGA AGAAGCCTGG GTCCTCGGTG

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		AAGGTCTCCT GCAAGGCTTC TGGAGGCACC TTCAGCAGCT ATACTATCAG CTGGGTGCGA CAGGCCCCTG GACAAGGGCT TGAGTGGATG GGAAGGATCA TCCCTATCCT TGGTACAGCA AACTACGCAC AGAAGTTCCA GGGCAGAGTC ACGATTACCG CGGACAAATC CACGAGCACA GCCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA CTGTGCGAGA GA
320	IGKV3-11*01 n.º de Ref. IMGT	CTGCAGCTGG AAGCTCAGCT CCCACCCAGC TGCTTTGCAT GTCCCTCCCA GCTGCCCTAC CTTCCAGAGC CCATATCAAT GCCTGTGTCA GAGCCCTGGG GAGGAACTGC TCAGTTAGGA CCCAGAGGGA ACCATGGAAG CCCCAGCTCA GCTTCTCTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGGTGAGGGG AACATGAGGT GGTTTTGCAC ATTAGTGAAA ACTCTTGCCA CCTCTGCTCA GCAAGAAATA TAATTAAAAT TCAAAGTATA TCAACAATTT TGGCTCTACT CAAAGACAGT TGGTTTGATC TTGATTACAT GAGTGCATTT CTGTTTTATT TCCAATTTCA GATACCACCG GAGAAATTGT GTTGACACAG TCTCCAGCCA CCCTGTCTTT GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA GCAGCTACTT AGCCTGGTAC CAACAGAAAC CTGGCCAGGC TCCCAGGCTC CTCATCTATG

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		ATGCATCCAA CAGGGCCACT GGCATCCCAG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCACTCT CACCATCAGC AGCCTAGAGC CTGAAGATTT TGCAGTTTAT TACTGTCAGC AGCGTAGCAA CTGGCCTCCC ACAGTGATTC CACATGAAAC AAAAACCCCA ACAAGACCAT CAGTGTTTAC TAGATTATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GACAGCTAGT GGGGTGGCCA CTCAGTGTTA GCATCTCAGC TCTATTTGGC CATTTTGGAG TTCAAGT
321	CEA CDR-H1	véase la Tabla 81
322	CEA CDR-H2	véase la Tabla 81
323	CEA CDR-H3	véase la Tabla 81
324	CEA CDR-L1	véase la Tabla 81
325	CEA CDR-L2	véase la Tabla 81
326	CEA CDR-L3	véase la Tabla 81
327	VH de unión a CEA progenitora	véase la Tabla 81
328	VL de unión a CEA progenitora	véase la Tabla 81
329	VH de unión a CEA humanizada	véase la Tabla 81
330	VL de unión a CEA humanizada	véase la Tabla 81
331	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 82
332	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
333	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 82
334	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82
335	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	véase la Tabla 84
336	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 84
337	anti- CEA(T84.66-LCHA) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	véase la Tabla 84
338	anti- CEA(T84.66-LCHA) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 84
339	Secuencia nucleotídica anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de ligando dimérico de Fc agujero (71-248)	véase la Tabla 87
340	Secuencia nucleotídica anti- CEA (T84.66-LCHA) ligando monomérico	véase la Tabla 87

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	de Fc pomo (71-248)	
341	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de ligando dimérico de Fc agujero (71-248)	véase la Tabla 87
342	anti- CEA (T84.66-LCHA) ligando monomérico de Fc pomo (71-248)	véase la Tabla 87
343	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 88
344	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66) cadena ligera	véase la Tabla 88
345	anti- CEA (T84.66) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 88
346	anti- CEA (T84.66) cadena ligera	véase la Tabla 88
347	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	véase la Tabla 89
348	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 89
349	anti- CEA(T84.66) cadena de ligando	véase la Tabla 89

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
	dimérico de Fc agujero	
350	anti- CEA(T84.66) ligando monomérico de Fc pomo	véase la Tabla 89
351	Secuencia nucleotídica hu NA3B3A2-avi His	véase la Tabla 92
352	NA3B3A2 humano -avi-His	véase la Tabla 92
353	Secuencia nucleotídica de hu OX40L dimérico (51-183) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 97
354	Secuencia nucleotídica hu OX40L monomérico (51-183) – CH1*	véase la Tabla 97
355	hu OX40L dimérico (51-183) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 97
356	hu OX40L monomérico (51-183) – CH1*	véase la Tabla 97
357	CD19 (8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS
358	CD19 (8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETS TGTTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		QLLEDPYTFGQGTKLEIK
359	CD19 (8B8-7H07) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSS
360	CD19 (8B8-7H07) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETS TGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QATHIPYTFGQGTKLEIK
361	CD19 (8B8-2B03) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYITHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGPDLFDYWGQGTTVTVSS
362	CD19 (8B8-2B03) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETS TGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QLTHVPYTFGQGXKLEIK
363	CD19 (8B8-5A07) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
364	CD19 (8B8-5A07) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETS TGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QPGHYPGTFGQGTKLEIK
365	CD19 (8B8-5D08) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSS
366	CD19 (8B8-5D08) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETS TGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QLTHEPYTFGQGTKLEIK
367	CD19 (8B8-5B08) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS
368	CD19 (8B8-5B08) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETS TGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QLDSYPNTFGQGTKLEIK
369	CD19 (8B8-5H09) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKY TEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
370	CD19 (8B8-5H09) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESS TGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QLIDYPVTFGQGTKLEIK
371	hu OX40L dimérico (51-183) conectado mediante el enlazador $(G4S)_2$	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKE DEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNI SLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYK DKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPG EFCVLGGGGSGGGGSQVSHRYPRIQSIKVQ FTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCD GFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLK KVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLD DFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
372	hu OX40L dimérico (52-183) conectado mediante el enlazador $(G4S)_2$	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKED EIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNIS LHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKD KVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGE FCVLGGGGSGGGGSVSHRYPRIQSIKVQFTE YKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGF YLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKV RSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDF HVNGGELILIHQNPGEFCVL
373	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA

SEC ID Nº:	Nombre	Secuencia
		ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGL
374	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
375	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAA GAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGL

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., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y citan de acuerdo con el sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) tal como se ha definido anteriormente.

***

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.

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 inmunoglobulina humana se proporciona en: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Publicación NIH Nº 91-3242.

Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria.

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados 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.

Técnicas de cultivo celular

Se usaron técnicas estándar de cultivo tal como se describen en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Purificación de proteínas

Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados en referencia a protocolos convencionales. En resumen, se aplicaron los anticuerpos a una columna de proteína A Sefarosa (GE Healthcare) y se lavaron con PBS. La elución de los anticuerpos se logró a pH 2,8 seguido de la inmediata neutralización de la muestra. La proteína agregada se separó de los anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, NaCl 150 mM pH 6,0. Se agruparon las fracciones de anticuerpo monomérico, se concentraron (en caso necesario) usando, por ejemplo, un concentrador por centrifugación Amicon Ultra (30 MWCO) de MILLIPORE, se congelaron y se almacenaron a -20 °C o -80 °C. Se proporcionó una parte de las muestras para su posterior análisis de proteínas y caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

Se usó el sistema de gel precolado NuPAGE® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usaron geles precolados NuPAGE® Novex® Bis-TRIS al 10 % o 4-12 % (pH 6,4) y un NuPAGE® MES (geles reducidos, con aditivo de tampón de ejecución antioxidante NuPAGE®) o tampón de ejecución MOPS (geles no reducidos).

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y estado oligomérico de los anticuerpos se llevó a cabo mediante cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A a una columna TSKgel G3000SW de Tosoh en NaCl 300 mM, $KH_2PO_4/K_2HPO_4$50 mM, pH 7,5 en un sistema HPLC 1100 de Agilent o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en PBS 2 x en un sistema HPLC de Dionex. La proteína eluida se cuantificó mediante absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. Sirvió como patrón el patrón de filtración en gel de BioRad 151-1901.

Espectrometría de masas

Esta sección describe la caracterización de los anticuerpos multiespecíficos con intercambio de VH/VL (CrossMabs de VH/VL) enfatizando en su correcto ensamblaje. Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante ionización por electropulverización-espectrometría de masas (IEN-EM) de los CrossMab intactos desglucosilados y de los CrossMabs desglucosilados/digeridos con plasmina

o como alternativa desglucosilados/digeridos con LysC limitado.

Los CrossMab de VH/VL se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37 °C durante hasta 17 h a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las digestiones de plasmina o LysC limitado (Roche) se llevaron a cabo con 100 µg de CrosMab de VH/VL desglucosilados en un tampón Tris, pH 9 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas se desalaron las muestras mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó mediante ESI-MS en un sistema maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Determinación de la unión y de la afinidad de unión de los anticuerpos multiespecíficos para los respectivos antígenos usando resonancia de plasmón superficial (SPR) (BIACORE)

Se investigó la unión de los anticuerpos generales a sus respectivos antígenos mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). En resumen, para las medidas de afinidad, se inmovilizan anticuerpos JIR 109-005-098 de cabra anti-IgG humana en una microplaca CM5 mediante acoplamiento de amina para la presentación de los anticuerpos contra el antígeno respectivo. La unión se mide en tampón HBS (HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005 %, pH 7,4), 25 °C (o como alternativa a 37 °C). El antígeno (de R&D Systems o purificado internamente) se añadió en varias concentraciones en solución. La asociación se midió mediante una inyección de antígeno de 80 segundos a 3 minutos; la disociación se midió lavando la superficie de la microplaca con tampón HBS durante 3-10 minutos y se estimó un valor de KD usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Los datos de control negativo (por ejemplo, curvas de tampón) se restaron de las curvas de muestra para la corrección de la deriva basal intrínseca del sistema y para la reducción del ruido de la señal. Se usó el programa informático de evaluación de Biacore respectivo para el análisis de los sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad.

Ejemplo 1

Preparación, purificación y caracterización de 4-1BB

Se subclonaron las secuencias de ADN que codifican los ectodominios de 4-1BB humano, de ratón o de cinomolgo (tabla 31) en fase con los dominios CH2 y CH2 de cadena pesada de IgG1 humana en el pomo (Merchant et al., 1998). Se

introdujo un sitio de escisión de proteasa AcTEV entre un ectodominio del antígeno y la Fc de IgG1 humana. Se introdujo un marcador Avi para la biotinlación dirigida en el extremo C-terminal del antígeno-Fc de pomo. La combinación del antígeno-cadena de Fc de pomo que incluye las mutaciones S354C/T366W, con una cadena Fc de agujero que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V permite la generación de un heterodímero que incluye una sola copia de la cadena que contiene el ectodominio de 4-1BB, creando de este modo una forma monomérica de antígeno ligado a Fc (figura 5). La tabla 22 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de las construcciones de fusión de antígeno-Fc.

Tabla 31: Numeración de aminoácidos de ectodominios (ECD) de antígeno y su origen

SEC ID Nº:	Construcción	Origen	ECD
83	ECD de 4-1BB humano	Sintetizado de acuerdo con Q07011	aa 24-186
84	ECD de 4-1BB de cinomolgo	aislado de sangre de cinomolgo	aa 24-186
85	ECD de 4-1BB murino	Sintetizado de acuerdo con P20334	aa 24-187

Tabla 32: Secuencias de ADNc y aminoácidos de moléculas de fusión de Fc (kih) de antígeno monomérico

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
86	Secuencia nucleotídica cadena de agujero de Fc	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
		CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
87	Secuencia nucleotídica cadena de Fc pomo de antígeno 4-1BB humano	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCA CCTTCTGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAG CCCCTGCCCCCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGC GGACAGCGGACCTGCGACATCTGCAGACAGTGCA AGGGCGTGTTCAGAACCCGGAAAGAGTGCAGCAG CACCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCCCGGC TTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCG AGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGACCAA GAAGGGCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTC AACGACCAGAAGCGGGGCATCTGCCGGCCCTGGA CCAACTGTAGCCTGGACGGCAAGAGCGTGCTGGT CAACGGCACCAAAGAACGGGACGTCGTGTGCGGC CCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGCA GCGTGACCCCTCCTGCCCCTGCCAGAGAGCCTGG CCACTCTCCTCAGGTCGACGAACAGTTATATTTTC AGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
		AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTG AACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCA CGAG
88	Secuencia nucleotídica antígeno 4-1BB de cinomolgo cadena Fc de pomo	TTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTAC ATTCTGTGATAATAACAGGAGTCAGATTTGCAGTC CCTGTCCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGA CAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAAG GTGTTTTCAAGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACC AGCAATGCAGAGTGTGACTGCATTTCAGGGTATCA CTGCCTGGGGGCAGAGTGCAGCATGTGTGAACAG GATTGTAAACAAGGTCAAGAATTGACAAAAAAAGG TTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAATGACCA GAAACGTGGCATCTGTCGCCCCTGGACAAACTGTT CTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACG AAGGAGAGGGACGTGGTCTGCGGACCATCTCCAG CCGACCTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCGACCCC GCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCG CAGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTC ACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
		GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTT CGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
89	antígeno 4-1BB murino cadena Fc de pomo	GTGCAGAACAGCTGCGACAACTGCCAGCCCGGCA CCTTCTGCCGGAAGTACAACCCCGTGTGCAAGAG CTGCCCCCCCCAGCACCTTCAGCAGCATCGGCGGC CAGCCCAACTGCAACATCTGCAGAGTGTGCGCCG GCTACTTCCGGTTCAAGAAGTTCTGCAGCAGCACC CACAACGCCGAGTGCGAGTGCATCGAGGGCTTCC ACTGCCTGGGCCCCCAGTGCACCAGATGCGAGAA GGACTGCAGACCCGGCCAGGAACTGACCAAGCAG GGCTGTAAGACCTGCAGCCTGGGCACCTTCAACG ACCAGAACGGGACCGGCGTGTGCCGGCCTTGGA CCAATTGCAGCCTGGACGGGAGAAGCGTGCTGAA AACCGGCACCACCGAGAAGGACGTCGTGTGCGGC CCTCCCGTGGTGTCCTTCAGCCCTAGCACCACCAT CAGCGTGACCCCTGAAGGCGGCCCTGGCGGACA CTCTCTGCAGGTCCTGGTCGACGAACAGTTATATT TTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
		CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGC CTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATG GCACGAG
90	cadena de agujero de Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
91	antígeno 4-1BB humano cadena Fc de pomo	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGG QRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFH CLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFND QKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSP ADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGS PKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
		ALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
92	antígeno 4-1BB de cinomolgo cadena Fc de pomo	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGG QRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGYHC LGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQ KRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPA DLSPGASSATPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSP KSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	
93	antígeno 4-1BB murino cadena Fc de pomo	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQ PNCNICRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCL GPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFNDQNG TGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVS FSPSTTISVTPEGGPGGHSLQVLVDEQLYFQGGSPK SADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

Todas las secuencias que codifican la molécula de fusión de 4-1BB-Fc se clonaron en un vector plasmídico, que dirige la expresión de la inserción a partir de un promotor de MPSV y contiene una secuencia de señal de poliA sintética situada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia OriP de EBV para el mantenimiento episómico del plásmido.

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 2: 1: 0,05 (“ECD de antígeno-AcTEV-Fc pomo”: “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 el sobrenadante se reemplazó 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 agitó vorticialmente 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. El medio de producción se suplementó con kifunensina 5 □M. Un día después de la transfección, se añadieron ácido valproico 1 mM y alimentación 1 al 7 % con suplementos al cultivo. 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, tampón que contiene cloruro de sodio 0,5 M (pH 7,5). La proteína unida se eluyó usando un gradiente de pH lineal de cloruro de sodio (de 0 a 500 mM) creado en 20 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, Tween 20 al 0,01 % (v/v), pH 3,0. Entonces se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, Tween 20 al 0,01 % (v/v), pH 3,0.

Se ajustó el pH de las fracciones recogidas añadiendo 1/40 (v/v) de Tris 2M, pH8.0. La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS 2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida de sodio al 0,02 % (p/v) de pH 7,4.

Para la determinación de la afinidad por el receptor humano, también se subclonó el ectodominio de 4-1BB humano en fase con un marcador avi (GLNDIFEAQKIEWHE) y uno de hexahistidina.

La producción de proteína se llevó a cabo tal como se describió anteriormente para la proteína de fusión de Fc. Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía quelante, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. La primera etapa cromatográfica se llevó a cabo en un cartucho NiNTA Superflow (5 ml, Qiagen) se equilibraron en fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, pH7.4. La elución se llevó a cabo aplicando un gradiente sobre 12 volúmenes de columna del 5 % al 45 % de tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, imidazol 500 mM, pH 7,4). La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS 2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida de sodio al 0,02 % (p/v) de pH 7,4 (tabla 33).

Tabla 33: Secuencias de la molécula 4-1BB humano monomérico-His

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
94	secuencia nucleotídica humano 4-1BB His	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCAC CTTCTGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCC CTGCCCCCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACA GCGGACCTGCGACATCTGCAGACAGTGCAAGGGCG TGTTCAGAACCCGGAAAGAGTGCAGCAGCACCAGCA ACGCCGAGTGCGACTGCACCCCCGGCTTCCATTGTC TGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGCAGGACTGC AAGCAGGGCCAGGAACTGACCAAGAAGGGCTGCAA GGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCG GGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGG ACGGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAAAGAAC GGGACGTCGTGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGATCTG TCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCCCCT GCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGGTCGACGAA CAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCAGGCCTGAACGAC ATCTTCGAGGCCCAGAAGATCGAGTGGCACGAGGCT CGAGCTCACCACCATCACCATCAC
95	4-1BB His humano	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQR TCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGA

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
		GCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGIC RPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGAS SVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSGLNDIFEAQKI EWHEARAHHHHHH

Ejemplo 2

2.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD19 (8B8-018)

2.1.1 Preparación, purificación y caracterización de fusión de Fc de antígeno CD19 para campaña de presentación en fago

Para expresar y purificar el ectodominio de CD19 de humano y de cinomolgo en un estado monomérico (CD19 humano, véase la SEC ID Nº: 31), se fusionó el fragmento de ADN respectivo a un segmento génico de Fc de IgG1 humana que contenía las mutaciones de "pomo" (humano: SEC ID Nº: 186; cinomolgo: SEC ID Nº: 188) y se transfectó con un “Fc-agujero” (SEC ID Nº: 86) homólogo (Merchant et al., 1998). Se introdujo un sitio de escisión de IgGA (PTPPTP) entre un ectodominio del antígeno y la cadena Fc pomo. Se introdujo un marcador Avi para la biotinilación dirigida en el extremo C-terminal de la cadena antígeno Fc pomo y se introdujeron las mutaciones H435R e Y436F en el Fc agujero con fines de purificación (Jendeberg L. et al., J. Immunological methods, 1997). La combinación del antígeno-cadena de Fc de pomo que incluye las mutaciones S354C/T366W (humano: SEC ID Nº: 187; cinomolgo: SEC ID Nº: 189), con una cadena Fc agujero que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/ Y407V (SEC ID Nº: 90) permite la generación de un fragmento de fusión de Fc heterodimérico que incluye una sola copia del ectodominio de CD19 (en analogía con la construcción 4-1BB en la figura 5C). La tabla 43 lista las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la construcción de fusión Fc-antígeno.

Tabla 43: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de molécula de fusión de Fc (kih) de antígeno CD19 humano y de cinomolgo monomérica

SEC ID Nº:	**Antígeno**	**Secuencia**
86	Secuencia nucleotídica cadena de agujero de Fc	véase la Tabla 32
186	Secuencia nucleotídica cadena de Fc pomo de antígeno CD19 marcador avi	CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGG CGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCT CCGATGGCCCTACCCAGCAGCTGACCTGGTCCAGA GAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTGAAGCTGTCTCT GGGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTC TGGCCATCTGGCTGTTCATCTTCAACGTGTCCCAGC AGATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCCC CCATCTGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCGT GAACGTGGAAGGATCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGA ACGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTG AAGAACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCCCCAG CGGCAAACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGGG CCAAGGACAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCT CCTTGCCTGCCCCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAG CCTGAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCA CACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCT GTGTCTAGAGGCCCTCTGAGCTGGACCCACGTGCA CCCTAAGGGCCCTAAGAGCCTGCTGAGCCTGGAAC TGAAGGACGACAGGCCCGCCAGAGATATGTGGGTC ATGGAAACCGGCCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGC CCAGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCA ACCTGACCATGAGCTTCCACCTGGAAATCACCGCCA GACCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAACAGGC GGCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGAC ACCTCCGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCC GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA

SEC ID Nº:	**Antígeno**	**Secuencia**
		GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCC CAGAAGATTGAATGGCACGAG
90	Secuencia polipeptídica cadena de agujero de Fc	véase la Tabla 32
187	Secuencia polipeptídica cadena de Fc pomo de antígeno CD19 humano marcador avi	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE SPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGG FYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSD LGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRP EIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARD MWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEIT ARPVLWHWLLRTGGWKVDASGGSPTPPTPGGGSAD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV

SEC ID Nº:	**Antígeno**	**Secuencia**
		KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
188	Secuencia nucleotídica cadena de Fc pomo de antígeno CD19 de cinomolgo marcador avi	CCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGG CGACAATGCCGTGCTCCAGTGCCTGGAAGGCACCT CCGATGGCCCTACACAGCAGCTCGTGTGGTGCAGA GACAGCCCCTTCGAGCCCTTCCTGAACCTGTCTCTG GGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCCCTCT GGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAACCA GACCGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCTGC CAAGCGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTG TCCGTGGAAGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAA CGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGA AGAACAGAAGCAGCGAGGGCCCTAGCAGCCCCAGC GGCAAGCTGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGGGC CAAGGACAGACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCT GTGTGTGGCCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAG CCTGAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCA CACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCT GTGTCCAGAGGCCCTCTGAGCTGGACACACGTGCG GCCAAAGGGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGAGCCTGG AACTGAAGGACGACCGGCCCGACCGGGATATGTGG GTGGTGGATACAGGCCTGCTGCTGACCAGAGCCAC AGCCCAGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGAG GCAACTGGACCAAGAGCTTTTACCTGGAAATCACCG CCAGACCCGCCCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAATC GGAGGCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCC GACACCTCCGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA GCCGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA

SEC ID Nº:	Antígeno	Secuencia
		GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGG CCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
189	Secuencia polipeptídica cadena de Fc pomo de antígeno CD19 de cinomolgo marcador avi	PQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRD SPFEPFLNLSLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGG FYLCQPGLPSEKAWQPGWTVSVEGSGELFRWNVSDL GGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQLYVWAKDRPE MWEGEPVCGPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDR DMWVVDTGLLLTRATAQDAGKYYCHRGNWTKSFYLEI TARPALWHWLLRIGGWKVDASGGSPTPPTPGGGSAD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

Para la producción de moléculas de fusión de antígeno monomérico/Fc, se transfectaron de manera conjunta células CHO que crecían en suspensión en fase exponencial con dos plásmidos que codifican los dos componentes de la proteína de fusión (cadenas de pomo y agujero) usando métodos convencionales.

La proteína secretada se purificó a partir del sobrenadante 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 un volumen de columna de MabSelect Sure (VC = 5-15 ml, resina de GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio (20 mM), citrato de sodio (20 mM), tampón de cloruro de sodio 0,5 M (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando un gradiente lineal; etapa 1, 10 VC de tampón de elución del 0 al 60 % (citrato de sodio 20 mM, tampón de cloruro de sodio 500 mM (pH 2,5)); etapa 2, 2 VC de tampón de elución del 60 al 100 %. Para el gradiente lineal se añadió una etapa adicional de elución de 2 volúmenes de columna con tampón de elución al 100 %.

Se ajustó el pH de las fracciones recogidas añadiendo 1/40 (v/v) de Tris 2M, pH8.0. La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con MOPS 2 mM, cloruro de sodio 150 mM, solución de azida de sodio al 0,02 % (p/v) de pH 7,4.

La tabla 44 resume el rendimiento y contenido final de monómero de la proteína de fusión de Fc (kih) de antígeno CD19 humano y de cinomolgo monomérico.

Tabla 44 - Análisis bioquímico de proteína de fusión de Fc (kih) de antígeno CD19 humano y de cinomolgo monomérico

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
proteína de fusión de Fc (kih) de CD19 humano monomérico	91	0,2
proteína de fusión de Fc (kih) de CD19 de cinomolgo monomérico	95	3,56

Una parte del antígeno purificado se biotiniló *in vitro* usando el kit de reacción de ligasa de biotina-proteína convencional BirA (Avidity, n.º de cat. BirA500) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El grado de biotinilación para la fusión que contenía CD19 humano fue del 94 %, para la construcción de CD19 de cinomolgo respectiva fue del 100 %. La proteína biotinilada se fusionó entonces para la selección, exploración y caracterización de clones procedentes de 8B8 madurados por afinidad desprovistos de los puntos calientes de desamidación N27d y N28.

7.1.2 Generación del clon 8B8-018 anti-CD19

7.1.2.1 Inmunización y generación de anticuerpos anti-CD19 humano (hibridomas) de ratón

Se inmunizaron ratones BALB/c seis veces y se les reforzó con células HEK293 transfectadas con CD19 (densidad media de receptor 35.000 por célula). La respuesta inmunitaria se controló ensayando muestras de suero con un ELISA de células-CD19 en células HIH-3T3 transfectadas con CD19. Se usaron timocitos de ratones con títulos suficientes de anticuerpo anti-CD19 humano para su inmortalización mediante fusión con la línea celular P3X63 Ag8.653 de mieloma de ratón. Se llevaron a cabo tres fusiones y los sobrenadantes de hibridoma se exploraron mediante ELISA de células en células NIH-3T3 transfectadas con CD19 humano y mediante ensayo de unión FACS usando células Daudi (CD19+) y CD19- para anticuerpos específicos anti-CD19 humano (véase el ejemplo 1 del documento WO 2011/147834).

7.1.2.2 Exploración de hibridoma y evaluación funcional biológica celular del anticuerpo anti-CD19

<u>ELISA de células para la exploración de anticuerpos contra CD19 humano</u>

Se aplicó un ELISA de células para la exploración de hibridomas, y para identificar aquellos hibridomas que secretan anticuerpos contra CD19 humano. Se usaron células NIH3T3 transfectadas con CD19 humano como células positivas; se usaron células NIH3T3 no transfectadas como células de control negativo. Para la evaluación de los hibridomas positivos se cuantificó la relación de DO entre células NIH3T3 transfectadas y no transfectadas.

- Medio de cultivo: DMEM alto en glucosa (4,5 mg/ml), FCS al 10 %, piruvato de Na, NEAA, Glutamina
- Anticuerpos de control positivo: anticuerpo monoclonal anti-CD19 (IgG1) Pharmigen n.º de cat. 555409 c = 1 mg/ml
- Anticuerpo de detección: IgG de cabra anti-ratón (H+L) conjugada a HRP Bio-Rad n.º de cat. 170-06516
- Dilución 1: 2000 en reactivo de bloqueo de ELISA 1x
- Otros reactivos: Fibronectina Roche n.º de cat. 838039 c = 1 mg/ml
- Glutardialdehído: solución madre al 25 % // Grado agar científico n.º R102 Concentración final: 0,05 % en PBS

- Reactivo de bloqueo de ELISA: solución madre 10 x // Roche n.º de cat. 1112589
- Sustrato de TMB: Roche n.º de cat. 11432559
- Solución de parada: H_2SO_4 1 M
- BioRad n.º de cat. 170-6516 Dilución 1: 2000 en reactivo de bloqueo de ELISA 1x

Día 1:

- Recubrimiento de fibronectina: 5 µg/cm² en PBS; placa de 96 pocillos = 32 cm²; 160 µg/placa en 6 ml
- PBS, 50 µl/pocillo
- incubación de 45 min a TA, aspiración de la solución de recubrimiento
- Siembra de 1,25 x 10^4células/pocillo en 50 µl de medio de cultivo en una placa de 96 pocillos
- incubación 40 horas a 37 °C
- Añadir a la mitad superior de la placa: células NIH3T3 que expresan CD19
- Añadir a la mitad inferior de la placa: células NIH3T3 no transfectadas

Día 3:

- Adición de anticuerpo de control positivo o muestras (sobrenadante o suero de ratón) en 50 µl de medio de cultivo
- incubación durante 2 h a 4 °C
- Retirada del medio, fijación de las células con 100 µl de glutaraldehído (al 0,05 % en PBS)
- Lavado dos veces con 200 µl de PBS
- Adición de anticuerpo de detección a 1:2000, 50 µl/pocillo
- incubación de 2 h a TA
- lavado tres veces con 200 µl de PBS
- adición de 50 µl de TMB, incubación durante 30 min a TA,
- detención mediante adición de 25 µl de H_2SO_4 1 M; lectura de la extinción a 450 nm/620 nm

- Cálculo de los resultados: relación de DO de CD19 de NIH3T3: DO de NIH3T3 no transfectadas

El anticuerpo seleccionado demostró unión específica a células NIH3T3 transfectadas con CD19 en comparación con células NIH3T3 no transfectadas (véase el ejemplo 2 del documento WO 2011/147834).

2.1.2.3 Humanización del anticuerpo anti-CD19

La especificidad de unión a CD19 del anticuerpo murino se transfirió a un armazón aceptor humano para eliminar los problemas de inmunogenicidad potenciales que surgen en secciones de secuencia que el cuerpo humano reconocería como exógenas. Esto se llevó a cabo injertando las regiones determinantes de la complementariedad completas (CDR) del anticuerpo murino (donante) a un armazón de anticuerpo humano (aceptor), y se denomina injerto de CDR o humanización de anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos murina se alineó con una colección de genes V de anticuerpo de línea germinal, y se clasifica de acuerdo con la identidad y homología de secuencia. Antes de seleccionar una secuencia aceptora concreta, hay que determinar las denominadas estructuras de bucle canónicas del anticuerpo donante (Morea, V., et al., Methods, Vol 20, 3ª Edición (2000) 267-279). Estas estructuras de bucle canónicas se determinan por el tipo de restos presentes en las denominadas posiciones canónicas. Estas posiciones se encuentran (parcialmente) fuera de las regiones CDR, y deben mantenerse funcionalmente equivalentes en la construcción final para mantener la conformación de CDR del anticuerpo parental (donante). Se seleccionó la secuencia de línea germinal humana VBASE_VH1_1 como aceptora para la cadena pesada y se seleccionó la secuencia VBASE_VK2_5 para la cadena ligera.

2.1.2.4 Eliminación de puntos calientes para desamidación

Se ha descubierto que el anticuerpo anti-CD19 humano humanizado de tipo silvestre tiene tres puntos calientes de desamidación en la HVR-L1: **N**S**N**G**N**T (SEC ID Nº: 190). Además, se ha descubierto que en la HVR-H2 hay presente un punto caliente de desamidación adicional: KF**N**G (SEC ID Nº: 191). Para abordar el punto caliente de desamidación en la HVR-H2 se introdujo una mutación puntual de N (Asn) a Q (Gln) en la posición 64 (numeración de acuerdo con Kabat). Por lo tanto, el anticuerpo, tal como se comunica en el presente documento, tiene una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TEKFQGRVTM (SEC ID Nº: 192).

Para abordar los puntos de desamidación en la cadena ligera y para obtener un anticuerpo anti-CD19 humano humanizado con estabilidad a la desamidación mejorada se introdujeron mutaciones individuales en las posiciones de Kabat 27d, 27e, 28 y 29 y una doble mutación en las posiciones 27e y 28 (numeración de acuerdo con Kabat). En total se generaron 9 variantes (var.1 a var.9) del anticuerpo humanizado de tipo silvestre (var.0) (véase la tabla 45).

Tabla 45: Variantes del anticuerpo de CD19 de tipo silvestre humanizado

	Kabat posición 2222 7789 de LC:	Kabat posición 6 4 de HC:
var.0:ts	QSLENSNGNTYLNW	TEKFNGKATM
var.1:N27dH	QSLE**H**SNGNTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.2:N27dQ	QSLE**Q**SNGNTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.3:S27eA	QSLEN**A**NGNTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.4:S27eV	QSLEN**V**NGNTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.5:S27eP	QSLEN**P**NGNTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.6:N28Q	QSLENS**Q**GNTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.7:G29A	QSLENSN**A**NTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.8:G29V	QSLENSN**V**NTYLNW	TEKF**Q**GRVTM
var.9:S27eP/N28S	QSLEN**PS**GNTYLNW	TEKF**Q**GRVTM

variante → ↓parámetro	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
K_D (BIAcore) [nM]	5	250	136	2	1	6	54	4	16	45
$t_{1/2}$ [min]	-	0,1	1,1	105,2	191,5	43,6	4,4	51,5	17,6	4
unión a CD19 humano después de incubación a pH 7,4	46	0	75	84	85	95	91	72	83	83

variante → ↓parámetro	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[%]										
unión a CD19 humano después de incubación a pH 6,0 [%]	90	0	95	95	97	99	97	86	91	87
pico principal de SEC tras incubación [%]	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	-

Se ha descubierto que con una sola mutación en la posición 27e de acuerdo con Kabat de S (serina) a P (prolina) pueden abordarse todos los puntos calientes de desamidación en la HVR-L1. Esta es una mutación no del resto de N (asparagina) propenso a la desamidación, sino de un resto vecino.

Por lo tanto, el anticuerpo, tal como se comunica en el presente documento, tiene una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos LENPNGNT (SEC ID Nº: 193). En una realización, el anticuerpo anti-CD19 humano humanizado comprende una HVR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos LENPSGNT (SEC ID Nº: 194).

Además, estos anticuerpos mantienen la reactividad cruzada con CD19 de cinomolgo tal como se muestra en la **tabla 46** a continuación.

CE50 [µg/ml]	var.0	var.5	var.9
ECD de huCD19	0,087	0,084	0,089
ECD de cyCD19	0,313	0,255	0,435

El anticuerpo anti-CD19 humano humanizado de tipo silvestre (var.0) muestra

aproximadamente un 7,5 % de desamidación después de la purificación. Después de almacenamiento durante dos semanas a pH 7,4 la cantidad de anticuerpo desamidado aumenta a aproximadamente el 18,5 %. El anticuerpo variante con una mutación S27eP (var.5) muestra aproximadamente un 2 % de desamidación y un 2 % de formación de succinimida después de la purificación. Durante el almacenamiento a pH 7,4 durante dos semanas solo hay presente aproximadamente un 7,5 % de anticuerpo desamidado. Var. 5 se denomina clon 8B8-018 y se seleccionó para la preparación de las moléculas de unión a antígeno que contienen trímero de ligando de la familia de TNF dirigidas a TNF.

2.1.3 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a CD19 (8B8-018) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 3.1)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, tal como se ilustra en la figura 29 A: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al dominio CH de IgG1 humana, tal como se describe en la figura 29 B: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica al ligando 4-1BB fusionado al dominio CL en fase con los dominios CH2 y CH3 de cadena pesada de IgG1 humana en el pomo (Merchant, Zhu et al. 1998). Para mejorar el emparejamiento correcto se han introducido las siguientes mutaciones en los CH-CL cruzados. En el ligando de 4-1BB dimérico fusionado a CL humano, E123R y Q124K. En el ligando de 4-1BB monomérico fusionado a CH1 humano, K147E y K213E.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, **clon 8B8-018,** se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.

La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-

CD19-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CD19 ensamblados (**figura 30**, construcción 3.1).

La tabla 47 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente con CH-CL cruzados y restos cargados (construcción 3.1).

Tabla 47: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 3.1). * para restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia nucleotídica de hu 4-1BBL dimérico (71-254) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 3
130	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
203	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTC AAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCA AGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATATCAT GCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAAGGTCT CGAATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATG GCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGT CACTATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTT ACATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACAC CGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTAC

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		TACGGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGG GAACCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAA GGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAG CAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGT TCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCG TGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGT GCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA
204	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-	GACATCGTCATGACCCAGACACCCCTGTCCCTCT CTGTGACCCCTGGCCAGCCAGCCTCAATTAGCTG CAAGTCCTCTCAAAGTCTGGAGAACCCCAATGGG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	018) cadena ligera	AACACTTACCTTAATTGGTATCTGCAGAAACCCGG ACAATCCCCTCAACTCCTGATCTACAGGGTCTCTA AGAGATTCTCAGGCGTGCCAGATCGCTTTAGCGG TTCCGGGTCTGGCACAGACTTCACCTTGAAGATT AGTCGGGTTGAAGCTGAGGATGTGGGAGTCTATT ACTGTCTGCAGCTCACTCATGTGCCCTACACCTTT GGTCAGGGCACAAAACTGGAGATCAAGCGGACC GTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCCT CCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCG TGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT GCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGA AGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAAC CGGGGCGAGTGC
115	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
116	hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
205	anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNT YLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

2.1.4 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a CD19 (8B8-018) sin dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 3.2)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29A), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CL: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al dominio CH1 de IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29 B), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CH1: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH1 humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-018, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que

contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CD19-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CD19 ensamblados (figura 30, construcción 3.2).

La tabla 48 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene CH-CL cruzados sin restos cargados (construcción 3.2).

Tabla 48: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin restos cargados (construcción 3.2).

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
165	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-254) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 22
166	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1	véase la Tabla 22
203	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 47
204	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena	véase la Tabla 47

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	ligera	
117	Ligando dimérico (71-254) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 22
118	Ligando monomérico (71-254) – CH1	véase la Tabla 22
205	anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 47
206	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47

2.1.5 Preparación de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigido a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.3)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separados por enlazadores $(G4S)_2$ al extremo C-terminal de la cadena de Fc de agujero de IgG1 humana, tal como se ilustra en la figura 29C: Fc de agujero de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano. Un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo de IgG1 humana, tal como se describe en la figura 29D: Fc pomo de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-018, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero, con el pomo o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico de agujero de huIgG1 anti-CD19 que contiene las mutaciones

Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de ligando monomérico de pomo de huIgG1 anti-CD19 que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CD19 (figura 30, construcción 3.3).

La tabla 49 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.3).

Tabla 49: Secuencias de pares de bases de fusión de Fc (kih) PGLALA de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigido a CD19 (8B8-018) (construcción 3.3)

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
207	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCA AGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAA GGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATATCATGC ATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGA ATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGCT CCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCACT ATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTTACAT GGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCGCA GTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTACGG CTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACC ACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCC CCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGC ACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCT AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTG CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGC GGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTG AGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGC GGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAA CGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTAC AGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAG GCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTC TTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTG CAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTC TGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACA CGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCG GCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGG ATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAA CTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATC

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		TGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCA GAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGA CTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTT TTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGG GAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGC ACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCT AGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGG CATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGC TGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGC CGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
208	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico de Fc pomo	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCA AGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAA GGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATATCATGC ATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGA ATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGCT CCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCACT ATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTTACAT GGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCGCA GTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTACGG CTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACC ACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCT ACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA CGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC TGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGA GCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCG GCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAAC GTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACA GCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTG GTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCT TTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGA AGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC AGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCC GAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCA GGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACA CGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCG GCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
204	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47
209	anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGP ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSE
210	anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico de	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	Fc pomo	ALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREG PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRS E
206	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47

2.1.6 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a CD19 (8B8-018) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 3.4)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, en analogía al ilustrado en la Figura 29A: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-248) y fusionado al dominio CH de IgG1 humana, en analogía al descrito en la Figura 29B: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica al ligando 4-1BB fusionado al dominio CL en fase con los dominios CH2 y CH3 de cadena pesada de IgG1 humana en el

pomo (Merchant, Zhu et al. 1998). Para mejorar el emparejamiento correcto se han introducido las siguientes mutaciones en los CH-CL cruzados. En el ligando de 4-1BB dimérico fusionado a CL humano, E123R y Q124K. En el ligando de 4-1BB monomérico fusionado a CH1 humano, K147E y K213E.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-018, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-cadena Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CD19-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CD19 ensamblados (**figura 30**, construcción 3.4).

La tabla 50 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-018) con CH-CL cruzados y restos cargados (construcción 3.4).

Tabla 50: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 3.4). * restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
169	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-248) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 24
170	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL	véase la Tabla 24

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	monomérico (71-248) – CH1*	
203	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 47
204	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47
119	Ligando dimérico (71-248) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 24
120	Ligando monomérico (71-248) – CH1*	véase la Tabla 24
205	anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 47
206	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47

2.1.7 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a CD19 (8B8-018) sin dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 3.5)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de

IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29A), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CL: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-248) y fusionado al dominio CH1 de IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29 B), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CH1: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH1 humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-018, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CD19-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CD19 ensamblados (figura 30, construcción 3.5).

La tabla 51 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene CH-CL cruzados sin restos cargados (construcción 3.5).

Tabla 51: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin restos cargados (construcción 3.5).

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-248) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 25

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
172	Secuencia nucleotídica ligando monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 25
203	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 47
204	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47
173	Ligando dimérico (71-248) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 25
174	Ligando monomérico (71-248) – CH1	véase la Tabla 25
205	anti-CD19(8B8-018) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 47
206	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47

2.1.8 Preparación de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigido a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.6)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separados por enlazadores $(G4S)_2$ al extremo C-terminal de la cadena de Fc de agujero de IgG1 humana, tal como se ilustra en la **figura 29C**: Fc de agujero

de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano. Un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 29D**: Fc pomo de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-018, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero, con el pomo o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico de agujero de huIgG1 anti-CD19 que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de ligando monomérico de pomo de huIgG1 anti-CD19 que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CD19 (figura 30, construcción 3.6).

La tabla 52 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.6).

Tabla 52: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.6)

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
211	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTC AAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCA AGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATATCATG CATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAAGGTCTCG AATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCA CTATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTTAC ATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCG CAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTAC GGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGG CCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG AGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCG TGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGC CTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTT CTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTG AGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGA CCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCC CAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACT

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAA GAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTAC GTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGG CCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCT GCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCC GCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTT TCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAG AGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGG GCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGG CGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCC GACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGG GCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCT GCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGAC CCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGA CTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGT GGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCT CAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCC ACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGC CCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAG GCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCC TGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAG TGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGC TTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGA CTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGC TC
212	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTC AAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCA AGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATATCATG CATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAAGGTCTCG AATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	(71-248) de Fc pomo	CTATGACATCTGACACCAGTATCAGCACTGCTTAC ATGGAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGACACCG CAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACATATTACTAC GGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAA CCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC CTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGA AGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACC TGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGG TACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGA CAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCA TCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCT GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCA GCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCA AGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAG GCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACA GTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTC CTGCCGGGCTC
204	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47
213	anti-CD19(8B8-018) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSR

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKE LVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
214	anti-CD19(8B8-018) ligando monomérico (71-248) de Fc pomo	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGS ALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
206	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47

2.2 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD19 (procedentes de

8B8, maduradas por afinidad) y de las correspondientes moléculas de control

2.2.1 Generación de moléculas de unión anti-CD19 maduradas por afinidad procedentes de 8B8 desprovistas de puntos calientes

2.2.1.1 Selección de anticuerpos específicos de CD19 madurados por afinidad

La desamidación de los restos de asparagina en las posiciones 27d y 28, situadas en la CDR1 de la cadena ligera del clon 8B8 humanizado, da lugar a una reducción significativa en la actividad biológica. Por lo tanto, se generaron 2 bibliotecas de presentación en fagos en las que a) ambos restos de asparagina en las posiciones 27d y 28 se eliminaron y b) se aleatorizaron CDR adicionales de cadena pesada y ligera para seleccionar respecto de variantes de 8B8 con afinidad mejorada.

2.2.1.2 Generación de bibliotecas de maduración por afinidad de 8B8 desprovistas de puntos calientes de LCDR1

La generación de anticuerpos procedentes de 8B8 madurados por afinidad sin los sitios de desamidación N27d y N28, situados en LCDR1, se llevó a cabo mediante presentación en fagos usando protocolos convencionales (Silacci et al., 2005). En una primera etapa, las secuencias de ADN de VL y VH del clon progenitor 8B8 (SEC ID Nº: 215 y SEC ID Nº: 216) se clonaron en el fagémido de la invención que posteriormente se usó como molde para aleatorización. En una etapa posterior, se generaron dos bibliotecas para la selección de clones favorables mediante presentación en fago. Para eliminar las posiciones de puntos calientes anteriormente mencionadas, se usó para ambas bibliotecas un cebador de aleatorización de LCDR1 (SEC ID Nº: 217) que solo permitía los aminoácidos S T Q E en las posiciones 27d y 28. La biblioteca de maduración 1 se aleatorizó en la CDR1 y 2 tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, mientras que la biblioteca de maduración 2 se aleatorizó en la CDR1 y 3 de la cadena ligera y en la CDR3 de la cadena pesada. Las posiciones aleatorizadas en las regiones CDR respectivas se muestran en la **figura 31A**. Para la generación de la biblioteca de maduración 1, aleatorizada en la CDR1 y 2 tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, se ensamblaron tres fragmentos mediante PCR de "corte y empalme mediante extensión solapante" (SOE) y se clonaron en el vector de fago (**figura 31B**). Se usaron las siguientes combinaciones de cebador para generar los fragmentos de la biblioteca: fragmento 1 (LMB3 (SEC ID Nº: 222) y L1 inverso al azar de CD19 (SEC

ID Nº: 217), fragmento 2 (L2 directo al azar de CD19 (SEC ID Nº: 218) y H1 inverso al azar de CD19 (SEC ID Nº: 219), y fragmento 3 (H2 directo al azar de CD19 (SEC ID Nº: 220) y H3 inverso constante de CD19 (SEC ID Nº: 221) (**tabla 53**). Después de ensamblar cantidades suficientes de fragmento aleatorizado de longitud completa, se digirió con *Nco*I/*Nhe*I conjuntamente con un vector de fagémido aceptor tratado de manera idéntica. Se ligó un exceso molar de 3 veces de inserción de biblioteca con 10 μg de vector de fagémido. Los ligamientos purificados se usaron para 20 transformaciones, dando como resultado 2 x 10^9 transformantes. Las partículas de fagémido que mostraban la biblioteca de maduración por afinidad de 8B8 se rescataron y purificaron mediante purificación de PEG/NaCl para usarlo para las selecciones.

La generación de la segunda biblioteca, aleatorizada en la CDR1 y 3 de la cadena ligera y en la CDR3 de la cadena pesada, se efectuó de manera similar. Se usaron las siguientes combinaciones de cebador para generar los fragmentos de la biblioteca: fragmento 1 (LMB3 (SEC ID Nº: 222) y L1 inverso al azar de CD19 (SEC ID Nº: 217), fragmento 2 (L1 directo constante de CD19 (SEC ID Nº: 223) y L3 inverso al azar de CD19 (SEC ID Nº: 224), y fragmento 3 (L3 directo constante de CD19 (SEC ID Nº: 225) y H3 inverso al azar de CD19 (SEC ID Nº: 226) (**tabla 54**). Después de ensamblar cantidades suficientes de fragmento aleatorizado de longitud completa, se digirió con *Nco*I/*Kpn*I conjuntamente con un vector de fagémido aceptor tratado de manera idéntica. Se ligó un exceso molar de 3 veces de inserción de biblioteca con 20 μg de vector de fagémido. Los ligamientos purificados se usaron para 40 transformaciones, dando como resultado 2 x 10^9 transformantes. Las partículas de fagémido que mostraban la biblioteca de maduración por afinidad de 8B8 se rescataron y purificaron mediante purificación de PEG/NaCl para usarlo para las selecciones.

Tabla 53: Cebadores para la biblioteca L1_L2 / H1_H2 de maduración por afinidad y eliminación de puntos calientes

SEC ID	**Nombre**	**Secuencia**
217	CD19 L1 inverso aleatorio	CAG CTG CGG GCT CTG ACC CGG TTT CTG GAG ATA CCA GTT CAG 1 CGT 2 GCC 3 GGA 4 TTC CAG AGA TTG GCT GGA TTT GCA AGA AAT G 1: 40 % Y, 6 % A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 2: 40 % N, 6 % A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 3: 25 % S/T/Q/E, 4: 25 % S/T/Q/E

218	CD19 L3 directo aleatorio	CTC CAG AAA CCG GGT CAG AGC CCG CAG CTG CTG ATC TAC 5 GTA TCT 6 CGC 7 8 GGC GTT 9 GAT CGT TTC AGC GGT TCT GGA TCC GGC ACC 5: 30 % R, 20 % E, 5 % A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V. 6: 30 % K, 20 % S, 5 % A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 7: 40 % F, 5 % A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 8: 40 % S, 6,6 % A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 9: 50 % P, 50 % L
219	CD19 H1 inverso aleatorio	CAT CCA CTC CAG ACC CTG GCC CGG GGC CTG ACG AAC CCA 10 CAT 11 12 13 14 GAA 15 GTA ACC AGA TGC TTT GCA GCT CAC TTT AAC GGA AGC 10: 52 % H, 4 % G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I,11: 30 % I, 15 % Y, 5 % G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V,12: 52 % Y, 4 % G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I,13: 30 % D, 15 % G, 5 % A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 14: 52 % T, 4 % G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 15: 52 % T, 4 % G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I
220	CD19 H2 directo aleatorio	CAG GCC CCG GGC CAG GGT CTG GAG TGG ATG GGC 16 ATT 17 CCA 18 19 20 21 TCC 22 TAT ACC 23 AAA TTC CAG GGC CGC GTC ACG ATG ACC 16: 45 % Y, 5 % A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 17: 52 % N, 4 % G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 18: 40 % Y, 5 % G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 19: 30 % N, 15 % S, 5 % G/A/T/P/Y/H/D/E/Q/V/I, 20: 30 % D, 15 % G, 5 % A/S/T/P/Y/N/H/E/Q/V/I, 21: 52 % G, 4 % N/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 22: 30 % K, 15 % N, 4 % G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 23: 30 % E, 15 % Q, 5 % G/A/S/T/P/Y/N/H/D/V/I
221	CD19 H3 inverso constante	CGTCACCGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
222	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC

Tabla 54: Cebadores para la biblioteca L1_L3 / H3 de maduración por afinidad y eliminación de puntos calientes

SEC ID	Nombre	Secuencia
223	CD19 L1 directo constante	TGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAG
217	CD19 L1 inverso aleatorio	Véase la Tabla 53
224	CD19 L3 inverso aleatorio	TTT AAT TTC CAG TTT AGT TCC TTG ACC GAA GGT 24 25 26 27 28 29 CTG CAG ACA ATA GTA GAC GCC AAC GTC TTC AGC 24: 52 % Y, 4 % G/A/S/T/N/P/D/E/Q/V/L/I, 25: 52 % P, 4 % G/A/S/T/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 26: 42 % V, 10 % L, 4 % G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 27: 52 % H, 4 % G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 28: 42 % T, 10 % I, 4 % G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/L, 29: 45 % L, 11 % G, 4 % A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I
225	CD19 L3 directo constante	ACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACG
226	CD19 H3 inverso aleatorio	TT GGT GCT AGC AGA GCT TAC GGT CAC CGT GGT ACC TTG GCC CCA GTA ATC AAA 30 31 32 33 34 35 36 37 38 GCG TGC ACA ATA GTA AAC AGC GGT GTC 30: 50 % L, 3,8 % G/A/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 31: 50 % A, 4,2 % G/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 32: 50 % S, 4,2 % G/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 33: 50 % G, 4,2 % S/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 34: 50 % Y, 4,2 % G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 35: 50 % Y, 4,2 % G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 36: 50 % Y, 4,2 % G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 37: 50 % T, 4,2 % G/A/Y/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 38: 50 % G, 4,2 % Y/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I
222	LMB3	Véase la Tabla 53

2.2.1.3 Selección de clones procedentes de 8B8 desprovistos de los puntos

calientes de LCDR1 N27d y N28

Para la selección de clones madurados por afinidad desprovistos de los puntos calientes de LCDR1 N27d y N28, se llevaron a cabo dos estrategias de selección mediante presentación en fagos:

En la primera estrategia, la selección se ejecutó en proteína de fusión CD19 humano-Fc usando ambas bibliotecas de presentación en fagos. Las rondas de paneo se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente patrón: 1. unión de ~ 10^{12} partículas de fagémido a 30 nM de proteína CD19-Fc biotinilada durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml, 2. captura de proteína CD19-Fc biotinilada y partículas de fago unidas específicamente mediante adición de 5,4 × 10^7 perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina durante 10 min, 3. lavado de las perlas usando PBS/Tween20 5 x 1 ml y PBS 5 x 1 ml, 4. elución de las partículas de fago mediante la adición de 1 ml de TEA 100 mM durante 10 min y neutralización mediante la adición de 500ul de Tris/HCl 1 M pH 7,4, 5. reinfección de las bacterias TG1 de *E. coli* en crecimiento exponencial, y 6. infección con fago auxiliar VCSM13 y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido para usarlos en posteriores rondas de selección. Las selecciones se llevaron a cabo a lo largo de 3 rondas usado concentraciones menguantes de antígeno (30 x 10^{-9} M, 10 x 10^{-9} M, y 3 x 10^{-9} M). En las rondas 2 y 3, se efectuó la captura de complejos antígeno/fago usando placas de neutravidina en lugar de perlas de estreptavidina. Las placas de neutravidina se lavaron con PBS/Tween20 5x y PBS 5x. En la ronda 3, la placa de neutravidina se incubó durante toda la noche en 2 litros de PBS durante una selección de "tasa de disociación" antes de que el fago se eluyese de la placa. Además, se usó proteína CD19 de cinomolgo-Fc en la ronda 2 para enriquecer las moléculas de unión con reactividad cruzada.

En la segunda estrategia de selección, el paneo del fago se llevó a cabo en células que expresaban el ECD de CD19 de ser humano o de cinomolgo en la superficie celular. Para la transfección transitoria de células HEK, se generaron plásmidos de expresión que portaban las secuencias de ADN (de 5' a 3'= para los siguientes segmentos de proteína: un marcador Flag, un marcador SNAP, el ECD de CD19 de origen humano o de cinomolgo, y la región transmembrana del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (SEC ID Nº: 227 y 228). La expresión de las respectivas proteínas (SEC ID Nº: 229 y 230) en la superficie celular se confirmó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-Flag para la detección. Ambas librerías se expusieron en las primeras rondas de selección a células que expresaban la proteína de fusión que contenía ECD de CD19 de ser

humano o de cinomolgo. Para las siguientes rondas de paneo, se alternó consecuentemente la especie del ECD de CD19. Se usaron células transfectadas de manera transitoria con una proteína de membrana irrelevante para la pre-eliminación.

Se llevaron a cabo rondas de paneo de acuerdo con el patrón siguiente: 1. Transfección de células HEK con construcciones que expresan el ECD de CD19 o una proteína transmembrana irrelevante de acuerdo con el procedimiento convencional descrito anteriormente,
2. Incubación de las células durante un total de 48 h a 37 °C en in incubador con atmósfera de CO_2 al 5 %, 3. Aislamiento de células mediante centrifugación (3 min a 250 x g) y resuspensión de 1 x 10^7 células positivas a ECD de CD19 y 1 x 10^7 células negativas en PBS/BSA al 5 %, respectivamente,
3. Pre-eliminación de fago no específico incubando la fagoteca con 1 x 10^7 células negativas a CD19 durante 60 min a 4 °C usando un rotador de tubos que rota lentamente,
4. Centrifugación de las células a 250 x g durante 3 min y transferencia del sobrenadante a un tubo nuevo y adición de 1 x 10^7 células positivas a CD19 e incubación durante 60 min a 4 °C mediante rotación suave en un rotador de tubo,
5. Lavado de las células mediante centrifugación durante 1 min a 250 x g, aspiración del sobrenadante, y re-suspensión en 1 ml de PBS (8 veces),
6. Elución del fago con 1 ml de TEA 100 mM, incubación durante 5 min a TA, y neutralización del eluido con 500 µl de Tris-HCl 1 M, pH7.6,
7. reinfección de las bacterias TG1 de *E. coli* en crecimiento exponencial, y
8. infección con fago auxiliar VCSM13 y posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido para usarlos en posteriores rondas de selección. Las selecciones se llevaron a cabo a lo largo de 3 rondas.

Para ambas estrategias de selección, se identificaron las moléculas de unión específicas mediante ELISA del modo siguiente: se recubren placas de neutravidina con 100 µl de proteína CD19-Fc biotinilada 30 nM por pocillo. 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 fueron positivos en el ELISA para CD19 humano recombinante se ensayaron posteriormente en un ELISA basado en células usando células que estaban transfectadas de manera transitoria con plásmido de expresión que contenía ECD de CD19 humano (SEC ID Nº: 227). Este análisis se llevó a cabo del modo siguiente: 48 h después de la transfección, se recogieron y centrifugaron las

células HEK a 250 x g durante 5 min. Las células se resuspendieron entonces en PBS BSA al 2 % enfriado en hielo a 4 x 10^6 células/ml y se incubaron durante 20 min sobre hielo para bloquear los sitios de unión no específicos. Se distribuyeron 4 ×10^5 células en 100 µl en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se centrifugó a 250 x g y 4 °C durante 3 min. El sobrenadante se eliminó por aspiración y se diluyeron 50 µl de sobrenadante bacteriano que contenía fragmentos Fab solubles con 50 µl de PBS/BSA al 2 % enfriado en hielo, se añadió a la placa, se mezcló con las células y se incubó durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS enfriado en hielo antes de que se añadiesen 100 µl de PBS/BSA al 2 % por pocillo que contenían una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-Fab-HRP. Después de un tiempo de incubación de 1 h, las células se lavaron de nuevo 3 veces con PBS enfriado en hielo. Para el revelado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de "TMB-ELISA ultra de 1 etapa". Después de un tiempo de incubación de 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos que contenía 40 µl de H_2SO_4 1 M por pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm. Los clones que mostraban señales significativas sobre el fondo se sometieron a un experimento de exploración cinética mediante análisis por SPR usando un dispositivo ProteOn XPR36.

2.2.1.4 Identificación de variantes procedentes de 8B8 maduradas por afinidad mediante SPR

Para caracterizar adicionalmente los clones positivos en el ELISA, se midió la tasa de disociación mediante resonancia de plasmón superficial y se comparó con el clon 8B8 humanizado progenitor.

Para este experimento, se inmovilizaron 7000 UR de anticuerpo policlonal anti-Fab humano sobre los 6 canales de una microplaca GLM mediante acoplamiento de amina (acetato de na, pH 4,5, 25 µl/min, 240s) (orientación vertical). Cada sobrenadante bacteriano que contenía anticuerpo se filtró y se diluyó 2 veces en PBS, y después se inyectó durante 360 s a 25 µl/minuto para lograr niveles de inmovilización de entre 100 y 400 unidades de respuesta (UR) en orientación vertical. Inyección de CD19-Fc monomérico: Para las medidas cinéticas de una dosis, se cambió la dirección de la inyección a orientación horizontal, se inyectaron diluciones en serie de tres veces de CD19-Fc monomérico purificado (intervalos de concentración variantes entre 150 y 6 nM) de manera simultánea a 50 µl/min en los canales 1-4 separados, con tiempos de asociación de 180 s, y tiempos de disociación de 300 s. Se inyectó un fragmento Fc de IgG humana (150 nM) en el canal 5 como control negativo para la unión específica a CD19-Fc monomérico. Se

inyectó tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referenciación. La regeneración se llevó a cabo mediante dos pulsos de glicina 10 mM, pH 1,5 y NaOH 50 mM durante 30 s a 90 µl/min (orientación horizontal). Las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno en el programa informático ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas. Se identificaron los clones que expresaban Fab con las constantes de velocidad de disociación más lentas (**tabla 55**). Cabe destacar que las constantes de velocidad de disociación de los clones 5A07 y 5B08 no pudieron determinarse debido a un ajuste no adecuado. Sin embargo, se seleccionaron ambos clones debido a que los resultados obtenidos sugerían una disociación muy lenta. Se secuenciaron los dominios variables de los fagémidos correspondientes. De manera importante, ambos restos de asparagina en LCDR1 (posición 27d y 28) se reemplazaron por una serina o una treonina, demostrando que ambos sitios de desamidación estaban eliminados. Se muestra un alineamiento en la **figura 32**. Las CDR de los mejores clones se listan en la **tabla 56** (regiones variables de la cadena ligera) y en la **tabla 57** (regiones variables de la cadena pesada) (clon 5H09: (SEC ID Nº: 231-236); clon 7H07: (SEC ID Nº: 237-242); clon 2B03: (SEC ID Nº: 243-248); clon 2B11: (SEC ID Nº: 249-254); clon 5A07: (SEC ID Nº: 255-260); clon 5B08: (SEC ID Nº: 261-266); clon 5D08: (SEC ID Nº: 267-272).

Tabla 55: Constantes de disociación de clones seleccionados obtenidos en análisis de exploración con sobrenadante bacteriano

Clon	**Constante de disociación kd (1/s)**
8B8 progenitor	3,01E-4
5H09	2,58E-4
7H07	5,75E-5
2B03	3,24E-5
2B11	4,37E-6
5A07	n.d.
5B08	n.d.
5D08	1,95E-4

Tabla 56: Secuencias de CDR de las cadenas ligeras de 8B8 seleccionadas

Clon	SEC ID Nº	CDR-L1	SEC ID Nº	CDR-L2	SEC ID Nº	CDR-L3
5H09	231	KSSQSLESSTGNTYLN	232	RVSKRFS	233	LQLIDYPVT
7H07	237	KSSQSLETSTGNTYLN	238	RVSKRFS	239	LQATHIPYT
2B03	243	KSSQSLETSTGNTYLN	244	RVSKRFS	245	LQLTHVPYT
2B11	249	KSSQSLETSTGTTYLN	250	RVSKRFS	251	LQLLEDPYT
5A07	255	KSSQSLETSTGNTYLN	256	RVSKRFS	257	LQPGHYPGT
5B08	261	KSSQSLETSTGNTYLN	262	RVSKRFS	263	LQLDSYPNT
5D08	267	KSSQSLETSTGNTYLN	268	RVSKRFS	269	LQLTHEPYT

Tabla 57: Secuencias de CDR de las cadenas pesadas de 8B8 seleccionadas

Clon	SEC ID Nº	CDR-H1	SEC ID Nº	CDR-H2	SEC ID Nº	CDR-H3
5H09	234	DYIMH	235	YINPYNDGSKYTEKFQG	236	GTYYYGSALFDY
7H07	240	DYIMH	241	YINPYNDGSKYTEKFQG	242	GTYYYGSELFDY
2B03	246	DYITH	247	YINPYNDGSKYTEKFQG	248	GTYYYGPDLFDY
2B11	252	DYIMH	253	YINPYNDGSKYTEKFQG	254	GTYYYGPQLFDY
5A07	258	DYIMH	259	YINPYNDGSKYTEKFQG	260	GTYYYGSALFDY
5B08	264	DYIMH	265	YINPYNDGSKYTEKFQG	266	GTYYYGPQLFDY

Clon	SEC ID Nº	CDR-H1	SEC ID Nº	CDR-H2	SEC ID Nº	CDR-H3
5D08	270	DYIMH	271	YINPYNDGSKYTEKFQG	272	GTYYYGSELFDY

2.2.2 Caracterización de anticuerpos procedentes de 8B8 madurados por afinidad

2.2.2.1 Clonación de dominios variables de anticuerpos en vectores de expresión

Se subclonaron las secuencias de ADN de regiones variables de cadena ligera y pesada de las moléculas de unión anti-CD19 en fase con la cadena pesada constante o la cadena ligera constante de IgG1 humana. En la cadena pesada, se han introducido las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2012/130831 A1.

Las secuencias de ADNc y de aminoácidos de las IgG anti-CD19 se muestran en la **tabla 50** y en la **tabla 59**, respectivamente. Todas las secuencias codificantes de anticuerpo se clonaron en un vector de expresión, que dirige la transcripción de la inserción con un promotor de MPSV quimérico y contiene una secuencia de señal de poli A sintética situada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia OriP de EBV para el mantenimiento episómico del plásmido.

Tabla 58: Secuencias de ADNc y de aminoácidos del clon 8B8 anti-CD19 en formato de IgG1 humana P329GLALA

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
273	cadena ligera progenitora de 8B8	GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTC TTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCT TGAAAACAGTAATGGAAACACCTATTTGAACTGGTACCTCCAG AAACCAGGCCAGTCTCCACAACTCCTGATCTACAGGGTTTCCA AACGATTTTCTGGGGTCCTAGACAGGTTCAGTGGTAGTGGATC AGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGA GGATTTGGGAGTTTATTTCTGCCTACAACTTACACATGTCCCG TACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA*CGTACG*

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGT
274	cadena pesada progenitora de 8B8	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCT GGGGCTTCAGTGAAGATGGCCTGCAAGGCTTCTGGATACACA TTCACTGACTATATTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGACTGGGC AGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGG TTCTAAGTACACTGAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACACTGACT TCAGACAAATCTTCCATCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCC TGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGA CCTATTATTATGGTAGCGCCCTCTTTGACTACTGGGGCCAAGG CACCACTCTCACAGTCTCCTCG*GCTAGCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
275	cadena ligera progenitora de 8B8	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYLQK PGQSPQLLIYRVSKRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCLQLTHVPYTFGGGTKLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
276	cadena pesada progenitora de 8B8	EVQLQQSGPELVKPGASVKMACKASGYTFTDYIMHWVKQKTGQ GLEWIGYINPYNDGSKYTEKFNGKATLTSDKSSITAYMELSSLTSE DSAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTLTVSS*ASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

Tabla 59: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de clones anti-CD19 madurados por afinidad en formato de IgG1 humana P329GLALA

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
277	cadena ligera de 2B11	GATATTGTCATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCC CGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCT GGAAACCTCCACCGGCACCACGTACCTGAACTGGTATCTCCA GAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATC

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		TAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGA TCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAGCT GAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGCTGGAAGAT CCATACACCTTCGGTCAAGGAACGAAACTGGAAATTAAACGTA CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
278	cadena pesada de 2B11	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGG GCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTT CACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCA GGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGG TTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATGAC CAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGA CTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTA CCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAG GTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
279	cadena ligera de 2B11	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQKP GQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
280	cadena pesada de 2B11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
281	cadena ligera de 7H07	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCC CGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCT GGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCA GAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATC TAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGA TCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAGCT GAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGGCAACCCATATCC

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		CATACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
282	cadena pesada de 7H07	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGG GCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTT CACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCA GGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGG TTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATGAC CAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGA CTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTA CCTACTACTACGGTTCTGAACTGTTTGATTACTGGGGCCAAGG TACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
283	cadena ligera de 7H07	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKP GQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCLQATHIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
284	cadena pesada de 7H07	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
285	cadena ligera de 2B03	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCC CGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTC TGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCC AGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTAT CTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTG GATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAG CTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGTTGACCCACGT TCCGTACACCTTCGGTCAAGGAANNAAACTGGAAATTAAACGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
286	cadena pesada de 2B03	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCG GGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACC TTCACTGACTATATCACGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGC CAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGAC GGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATG ACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTA GACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCG GTACCTACTACTACGGTCCAGATCTGTTTGATTACTGGGGCCA AGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
287	cadena ligera de 2B03	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKP GQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLTHVPYTFGQGXKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
288	cadena pesada de 2B03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYITHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTYYYGPDLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
289	cadena ligera de 5A07	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCC CGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTC TGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCC AGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTAT CTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTG GATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAG CTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCCAGGTCATTA CCCAGGTACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
290	cadena pesada de 5A07	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCG GGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACC TTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGC CAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGAC GGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATG ACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTA GACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCG GTACTTACTACTACGGTTCCGCCCTCTTTGATTACTGGGGCCA AGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
291	cadena ligera de 5A07	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQPGHYPGTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
292	cadena pesada de 5A07	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
293	cadena ligera de 5D08	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGACCCATGAACCATACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
294	cadena pesada de 5D08	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCG GGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACC TTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGC CAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGAC GGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATG ACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTA GACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCG GTACCTACTACTACGGTTCTGAACTGTTTGATTACTGGGGCCA AGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
295	cadena	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKP

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
	ligera de 5D08	GQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLTHEPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
296	cadena pesada de 5D08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
297	cadena ligera de 5B08	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCC CGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTC TGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCC AGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTAT CTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTG GATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAG CTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGGATTCTTA CCCAAACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
298	cadena pesada de	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCG GGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACC TTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGC

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
	5B08	CAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGAC GGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATG ACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTA GACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCG GTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCA AGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
299	cadena ligera de 5B08	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQKP GQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLDSYPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
300	cadena pesada de 5B08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
301	cadena ligera de 5H09	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCC CGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTC TGGAATCTTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGTATCTCCA GAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATC TAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTGG ATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAGC TGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGATCGATTAC CCAGTTACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACGTA CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
302	cadena pesada de 5H09	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCG GGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACC TTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGC CAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGAC GGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATG ACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTA

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
		GACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCG GTACCTACTACTACGGTTCTGCACTGTTTGATTACTGGGGCCA AGGTACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
303	cadena ligera de 5H09	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESSTGNTYLNWYLQKP GQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLIDYPVTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
304	cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLR

SEC ID Nº:	Clon y cadena	Secuencia
	de 5H09	SDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK

2.2.2.2 Determinación de la afinidad de los anticuerpos seleccionados mediante SPR

Para la determinación exacta de las afinidades mediante SPR, se produjeron los anticuerpos anti-CD19 seleccionados cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión en mamíferos usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes a una relación 1:1 ("vector de cadena pesada": “vector de cadena ligera”) de acuerdo con el procedimiento convencional. 7 días después de la transfección, se midió el título de anticuerpo en el sobrenadante y se equilibraron todos los títulos a 10 □/ml.

La afinidad (K_D) del anticuerpo progenitor 8B8 así como de sus derivados se midió mediante SPR usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C. Se inmovilizaron 7000 UR de anticuerpo policlonal anti-Fab humano en los 6 canales de una microplaca GLM mediante acoplamiento de amina (acetato de Na pH 4,5, 25 µl/min, 240s) (orientación vertical). Se filtró cada sobrenadante de HEK que contenía anticuerpo, se diluyó con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a una concentración de 10 µg/ml, y después se inyectó durante 360 s a 25 µl/minuto para lograr niveles de inmovilización entre 500 y 800 unidades de respuesta (UR) en orientación vertical. Inyección de CD19-Fc monomérico: Para las medidas cinéticas de una dosis, se cambió la dirección de la inyección a orientación horizontal, se inyectaron diluciones en serie de tres veces de CD19-Fc monomérico purificado (intervalos de concentración variantes entre 150 y 6 nM) de manera simultánea a 50 µl/min en los canales 1-4 separados, con tiempos de asociación de 180 s, y tiempos de disociación de 300 s. Se inyectó un fragmento Fc de IgG humana (150 nM) en el canal 5 como control negativo para la unión

específica a CD19-Fc monomérico. Se inyectó tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referenciar. Se muestra una descripción de los sensogramas respectivos en la **figura 33**. La regeneración se llevó a cabo mediante dos pulsos de glicina 10 mM, pH 1,5 y NaOH 50 mM durante 30 s a 90 µl/min (orientación vertical). 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}. Se muestra un resumen de los datos cinéticos y termodinámicos en la **tabla 60**. La constante de disociación de todos los clones madurados por afinidad se mejoró en comparación con su clon progenitor 8B8.

Tabla 60: Resumen de los datos cinéticos y termodinámicos para la interacción entre hulgG1 anti-CD19 y CD19 humano

Clon	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
8B8 progenitor	5,66E+4	1,34E-4	2,36E-9
5H09	7,91E+4	1,50E-5	1,89E-10
7H07	7,45E+4	5,57E-5	7,47E-10
2B03	6,02E+4	5,00E-5	8,31E-10
2B11	6,34E+4	3,14E-5	4,95E-10
5A07	6,98E+4	3,07E-5	4,40E-10
5B08	6,81E+4	5,26E-5	7,72E-10
5D08	8,88E+4	8,44E-5	9,51E-10

2.2.2.3 Preparación y purificación de IgG1 P329G LALA anti-CD19

Se produjeron los anticuerpos anti-CD19 seleccionados cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión en mamíferos usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los vectores de expresión correspondientes a una relación 1:1 ("vector de cadena pesada": "vector de cadena ligera").

Para la producción en matraces agitados de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Antes de la

transfección, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 210 x g, y el sobrenadante se reemplazó por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µl de PEI, la solución se agitó vorticialmente 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 añadió ácido valproico 1 mM y alimentación al 7 % con suplementos. Después de cultivar durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 15 minutos a 210 x 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.

La purificación de las moléculas de anticuerpo a partir de los sobrenadantes de cultivo celular se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad usando proteína A tal como se ha descrito anteriormente para la purificación de las fusiones de antígeno-Fc. La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, solución de NaCl 140 mM de pH 6,0.

La concentración de proteína de los anticuerpos purificados se determinó midiendo la DO a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. Se analizaron la pureza y el peso molecular de los anticuerpos mediante CE-SDS en presencia y ausencia de agente reductor (Invitrogen, EE.UU.) usando un LabChipGXII (Caliper). El contenido agregado de las muestras de anticuerpo 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 (**tabla 61**).

Tabla 61: Análisis bioquímico de clones de IgG1 anti-CD19 P329G LALA

Clon	Rendimiento [mg/l]	Monómero [%]	CE-SDS (no rojo)

8B8 progenitor	25,3	100	99,1
2B11	35,4	100	98,4
7H07	89,8	100	99,4
2B03	182	100	100
5A07	90,2	100	99,4
5D08	90,2	100	99,3
5B08	24,1	99,6	100
5H09	29,9	100	98,1

Se seleccionó el clon 2B11 para la preparación de construcciones biespecíficas ya que carece de los tres puntos calientes de desamidación.

Se sintetizó la secuencia de ADN codificante de parte del ectodominio (aminoácidos 71-254 y 71-248) del ligando 4-1BB humano de acuerdo con la secuencia P41273 de la base de datos UniProt.

2.2.3 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a CD19 (8B8-2B11) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 4.1)

La construcción 4.1 se preparó tal como se describe para la construcción 3.1 (**figura 30**), pero usando las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-2B11.

La tabla 62 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) con CH-CL cruzados y restos cargados (construcción 4.1).

Tabla 62: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 4.1). * para restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia nucleotídica de	véase la Tabla 3

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	hu 4-1BBL dimérico (71-254) – CL* cadena de Fc pomo	
130	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
305	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAA AAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAA AGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATATCATGC ACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGG AGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGG TTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTC ACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGT ACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACAC CGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACT ACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGG TACCACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAG GGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTC TGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAA
277	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59
115	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
116	hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
306	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		QLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206	anti-CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59

2.2.4 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a CD19 (8B8-2B11) sin dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 4.2)

La construcción 4.2 se preparó tal como se describe para la construcción 3.2 (**figura 30**), pero usando las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-2B11.

La tabla 63 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene CH-CL cruzados sin restos cargados (construcción 4.2).

Tabla 63: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin restos cargados (construcción 4.2).

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
165	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-254) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 22
166	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1	véase la Tabla 22
305	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
277	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59
117	Ligando dimérico (71-254) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 22
118	Ligando monomérico (71-254) – CH1	véase la Tabla 22
306	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
279	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 59

2.2.5 Preparación de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigido a CD19 (8B8-2B11) bivalente (construcción 4.3)

La construcción 4.3 se preparó tal como se describe para la construcción 3.3 (figura 30), pero usando las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-2B11.

La tabla 64 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) bivalente (construcción 4.3).

Tabla 64: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) PGLALA de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) bivalente (construcción 4.3)

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
307	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAA AAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAA GCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATATCATGCA CTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGA GTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTT CCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCAC GATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACA TGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCT GTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGG TCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCA CGGTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCC* *CTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGC* *ACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTG* *GTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT* *CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA* *CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG* *TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTA* *GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT* *GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG* *AAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA* *CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGA GCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCG GCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAAC GTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACA GCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTG GTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCT TTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGA AGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC AGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCC GAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCA GGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACA CGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGG ATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAA CTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATC TGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCA GAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGA CTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTT TTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGG GAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGC ACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCT AGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGG CATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGC TGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGC CGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
308	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) ligando monomérico de Fc pomo	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAA AAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAA GCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATATCATGCA CTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGA GTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTT CCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCAC GATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACA TGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCT GTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGG TCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCA CGGTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTAC CCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC TGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACT CCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAG GAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCC CCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCA GGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCG ATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGG CCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTG GTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTC AGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAG GATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAG CCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGA GGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAG TGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGC CTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCC TGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
277	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 59
309	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico de Fc agujero	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGP ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSE*
310	anti-CD19(8B8-	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	2B11) ligando monomérico de Fc pomo	WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREG PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRS E*
279	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 59

2.2.6 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a CD19 (8B8-2B11) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 4.4)

La construcción 4.4 se preparó tal como se describe para la construcción 3.4 (figura 30), pero usando las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-2B11.

La tabla 65 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) con CH-CL cruzados y restos cargados (construcción 4.4).

Tabla 65: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 4.4). * restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
169	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-248) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 24
170	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-248) – CH1*	véase la Tabla 24
305	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
277	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59
119	Ligando dimérico (71-248) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 24
120	Ligando monomérico (71-248) – CH1*	véase la Tabla 24
306	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de	véase la Tabla 62

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	Fc agujero	
279	anti-CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59

2.2.7 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a CD19 (8B8-2B11) sin dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 4.5)

La construcción 4.5 se preparó tal como se describe para la construcción 3.5 (figura 30), pero usando las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-2B11.

La tabla 66 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene CH-CL cruzados sin restos cargados (construcción 4.5).

Tabla 66: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin restos cargados (construcción 4.5).

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-248) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 25
172	Secuencia nucleotídica ligando	véase la Tabla 25

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	monomérico (71-248)-CH1	
305	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
277	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59
173	Ligando dimérico (71-248) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 25
174	Ligando monomérico (71-248) – CH1	véase la Tabla 25
306	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
279	anti-CD19(8B8-2B11) cadena ligera	véase la Tabla 59

2.2.8 Preparación de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigido a CD19 (8B8-2B11) bivalente (construcción 4.6)

La construcción 4.6 se preparó tal como se describe para la construcción 3.6 (figura 30), pero usando las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CD19, clon 8B8-2B11.

La tabla 67 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248)

separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) bivalente (construcción 3.6).

Tabla 67: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CD19 (8B8-2B11) bivalente (construcción 4.6)

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
311	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAA AAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAA AGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATATCATGC ACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGG AGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGG TTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTC ACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGT ACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACAC CGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACT ACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGG TACCACGGTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAG* *GGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC* *AAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGC* *TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGA* *CCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG* *GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTC* *TGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTG* *CCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT* *GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT* *GGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAA* *AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA* *GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC* *CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC* *CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG* *CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC* *GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA* *AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC* *CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG* *GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG* *GTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCA GAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTG CCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTG CCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACT GGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTA CAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAA CTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGC TCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGA GATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGA CAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCC GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCA TCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTG GCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCT GTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTG GGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGA GAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCT GGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCT CAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACG GACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGG CAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACA AAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGC TGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTG TGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTC TGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGT GGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAAC AGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGC ATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCT GACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCG CGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
312	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-2B11) ligando monomérico (71-248) de Fc pomo	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAA AAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAA AGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATATCATGC ACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGG AGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGG TTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTC ACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGT ACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACAC CGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACT ACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGG TACCACGGTGACCGTAAGCTCT*GCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGG TCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCG GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCC GGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCC CAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTG GCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTAC AAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAG GCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAC TGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCT CTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAG ATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACA GTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGG AATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGC ACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATC TGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGT TCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
277	Secuencia nucleotídica anti-CD19(8B8-	véase la Tabla 59

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	2B11) cadena ligera	
313	anti-CD19(8B8-2B11) cadena de ligando dimérico (71-248) de Fc agujero	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGL*
314	anti-CD19(8B8-2B11) ligando monomérico (71-248) de Fc pomo	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMH WVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVT MTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGP QLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL
279	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 59

2.3 Preparación de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado no dirigida e IgG humana como moléculas de control

2.3.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB humano no dirigidas (moléculas de control)

Estas moléculas de control se prepararon tal como se describe anteriormente para la construcción 3.1 dirigida a CD19 (denominada control B), 3.3 (denominada control C), 3.4 (denominada control D) y 3.5 (denominada control E) con la única diferencia que la molécula de unión anti-CD19 (VH-VL) se reemplazó por un control de línea germinal, denominado DP47, sin unión al antígeno (véase la figura 30).

La tabla 68 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado no dirigido de DP47 monovalente que contenía CH-CL cruzados con restos cargados, control B.

La tabla 69 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado no dirigido de DP47 bivalente, control C.

La tabla 70 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente que contenía CH-CL cruzados con restos cargados, control D.

La tabla 71 muestra, respectivamente, las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente sin restos cargados en el cruce CH-CL, control E.

Tabla 68: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigido de DP47 monovalente con cruce CH-CL y con restos cargados (control B). * restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
96	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
97	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254)-CH1	véase la Tabla 3
79	secuencia nucleotídica cadena de Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
80	secuencia nucleotídica de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
98	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
99	hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
81	cadena Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
82	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

Tabla 69: Secuencias de ADNc y aminoácidos de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) humano separado no dirigido de DP47 bivalente (control C).

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
177	secuencia nucleotídica cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la Tabla 27
178	secuencia nucleotídica cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la Tabla 27
80	secuencia nucleotídica de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
179	cadena de Fc agujero de DP47 fusionada a hu 4-1BBL dimérico (71-254)	véase la Tabla 27
180	cadena de Fc pomo de DP47 fusionada a hu 4-1BBL monomérico (71-254)	véase la Tabla 27
82	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

Tabla 70: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente con cruce CH-CL y con restos cargados (control D). * restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
169	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-248)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 24
170	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 24
79	secuencia nucleotídica cadena de Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
80	secuencia nucleotídica de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
119	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc	véase la Tabla 24

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	de cadena de pomo	
120	hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 24
81	cadena Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
82	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

Tabla 71: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente con cruce CH-CL y sin restos cargados (control E).

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
171	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL dimérico (71-248)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 25
172	secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 25
79	secuencia nucleotídica cadena de Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
80	secuencia nucleotídica de cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
173	hu 4-1BBL dimérico (71-248)-CL Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 25
174	hu 4-1BBL (71-248)-CH1 monomérico	véase la Tabla 25
81	cadena Fc agujero de DP47	véase la Tabla 18
82	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

5

2.3.2 Anticuerpos como moléculas de control

Se prepararon dos IgG1 humanas de control que contenían PGLALA.

La tabla 72 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la huIgG1 PGLALA anti-CD19 (clon 8B8-018), es decir, control G.

La tabla 73 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de huIgG1 PGLALA de DP47 (control F).

Tabla 72: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de huIgG1 PGLALA anti-CD19 (8B8-018) (control G)

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
315	secuencia nucleotídica CD19(8B8-018) cadena pesada (huIgG1 PGLALA)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCG AGGTCAAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAA GGTTTCATGCAAGGCAAGCGGATACACCT TCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGG CAGGCCCCTGGCCAAGGTCTCGAATGGA TGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAG AGTCACTATGACATCTGACACCAGTATCA GCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTT CGGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTG TGCCAGGGGCACATATTACTACGGCTCAG CTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAAC CACAGTAACCGTGAGCTCCGCAAGTACTA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CAGCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCCCCGGGCAAA
204	secuencia nucleotídica CD19 (8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47
316	CD19(8B8-018) cadena pesada (huIgG1 PGLALA)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGS KYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206	CD19 (8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 47

Tabla 73: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de hulgG1 PGLALA de DP47 (control F)

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
181	secuencia nucleotídica de cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	véase la Tabla 29
80	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18
182	cadena pesada de DP47 (hu IgG1 PGLALA)	véase la Tabla 29
82	cadena ligera de DP47	véase la Tabla 18

2.4 Producción de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas a CD19 y sus moléculas de control

Las secuencias que codifican la molécula de unión a antígeno de fusión de F (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigida y no dirigida se clonaron en un vector plasmídico que dirige la expresión de la inserción a partir de un promotor de MPSV y contiene una secuencia de poliA sintética situada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia OriP de EBV para el mantenimiento episómico del plásmido.

La molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado se produjo cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión en mamíferos usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión. Para las variantes 1, 2, 4, 5 y su control B, D y E, a una relación 1:1:1:1 ("vector de ligando dimérico-CL-cadena de pomo": "vector de fusión de ligando monomérico-CH1": "vector de Fab

anti-CD19-cadena de agujero": "vector anti-CD19 cadena ligera"). Para la variante 3, 6 y su control C, a una relación 1:1:1 ("vector de cadena de ligando dimérico de Fc de agujero de huIgG1": "vector de cadena de ligando monomérico de Fc pomo de huIgG1": "vector anti-CD19 cadena ligera"). Las IgG humanas, usadas como control en el ensayo, se produjeron como para la construcción biespecífica (para la transfección solo se usaron un vector para la cadena ligera y un vector para la cadena pesada).

Para la producción en matraces agitados de 500 ml, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 210 x g, y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µl de PEI, la solución se agitó vorticialmente 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 a las células 160 ml de medio Excell suplementado con L-glutamina 6 mM, PEPSOY 5 g/l y ácido valproico 1,2 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadió alimentación al 12 % (aminoácidos y glucosa). Después de cultivar durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos a al menos 400 x 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.

La molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado, así como la IgG, se purificó 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 MabSelect Sure (VC = 5-15 ml, resina de GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio (20 mM), tampón de citrato de sodio (20 mM) (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando bien un gradiente lineal (20 VC) o una elución por etapas (8 VC) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Para el gradiente lineal se añadió una etapa adicional de elución de 4 volúmenes de columna.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de

sodio 0,5 M, pH8.0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución de Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de la fusión de Fc(kih) de ligando de 4-1BB trimérico dirigida se analizó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con SimpleBlue™ SafeStain de Coomasie (Invitrogen, EE.UU.). 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.

La tabla 74 resume el rendimiento y contenido final de monómero de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigida a CD19.

Tabla 74: Análisis bioquímico de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas a CD19

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
molécula de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigida a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 3.1)	98	8,6
fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) dirigidas a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.3)	100	11,3
molécula de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigida a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 3.4)	99	11,5
molécula de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado	97	13,3

dirigida a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin restos cargados (construcción 3.5)		
fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) dirigidas a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.6)	96	19,9
molécula de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigida a CD19 (8B8-2B11) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 4.4)	99,2	21,2

La tabla 75 resume el rendimiento y contenido final de monómero de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado de DP47 no dirigida, tanto monovalentes (control B, D y E) como bivalente (control C).

Tabla 75: Análisis bioquímico de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado no dirigida de DP47

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 monovalente (control B)	99	15,4
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 bivalente (control C)	98	12,6
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 monovalente (control D)	99,5	25,9
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 monovalente (control E)	93,3	4,1

La tabla 76 resume el rendimiento y contenido final de monómero de la IgG1 PGLALA humana anti-CD19 (8B8-018) y DP47 de línea germinal (control F).

Tabla 76: Análisis bioquímico de la IgG1 PGLALA de control

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
huIgG1 PGLALA anti-CD19 (8B8-018)	100	36,6
IgG1 PGLALA humana de DP47 de línea germinal	100	50

Ejemplo 3

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD19

3.1. Resonancia de plasmón superficial (afinidad)

La unión de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas a CD19 (construcciones 3.4 y 3.6) a Fc (kih) de 4-1BB recombinante y a CD19 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).

Interacción con 4-1BB humano y de cinomolgo

El anticuerpo anti-Fab humano (Biacore, Friburgo/Alemania) se acopló directamente sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 8000 UR. Las fusiones de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas a CD19 se capturaron durante 60 segundos a 2 y 5 nM (también se inyectó control D). Se hizo pasar 4-1BB avi His de humano o de cinomolgo recombinante a un intervalo de concentración de 2,7 a 2000 nM (dilución de 3 veces) con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 120 segundos. La disociación se controló durante 180 segundos. Se corrigen las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. En este caso se hizo fluir los antígenos sobre una superficie con anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado pero sobre la que se había inyectado HBS-

EP en lugar de anticuerpos.

Interacción con CD19 humano

El anticuerpo anti-Fab humano (Biacore, Friburgo/Alemania) se acopló directamente sobre una microplaca CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina convencional (Biacore, Friburgo/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 8000 UR. Las fusiones de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas a CD19, o del anticuerpo de control (huIgG1 PGLALA anti-CD19 (8B8-018) se capturaron durante 60 segundos a 20 nM. Se hizo pasar CD19-Fc (kih) humano recombinante a un intervalo de concentración de 7,8 a 500 nM (dilución de 2 veces) con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 120 segundos. La disociación se controló durante 120/1800 segundos. Se corrigen las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. En este caso se hizo fluir los antígenos sobre una superficie con anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado pero sobre la que se había inyectado HBS-EP en lugar de anticuerpos.

Las constantes cinéticas se derivaron usando el programa informático de evaluación Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para unión de Langmuir 1:1 mediante integración numérica.

Las construcciones biespecíficas 3.4, 3.6 y control D se unen de manera similar a 4-1BB. **La tabla 77** muestra la media con la desviación estándar (entre paréntesis) de los dos experimentos (usando la solución de captura de construcción bien a 2 nM o a 5 nM). Las construcciones biespecíficas 3.4 y 3.6 se unen a CD19 humano con una afinidad similar a la de la IgG. Las constantes de afinidad para la interacción se determinaron ajustando a la unión de Langmuir 1:1. Para las medidas con hu4-1BB y cy4-1BB, se muestran la media y la desviación estándar (entre paréntesis) (dos experimentos con solución de captura a 2 o 5 nM).

Tabla 77: Unión de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigida a CD19 a (hu) 4-1BB humano recombinante, (cy) 4-1BB de cinomolgo y a (hu) CD19 humano.

	Antígeno	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigida a CD19 (8B8-018) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 3.4)	hu 4-1BB	7,2E+04 *(5,9E+03)*	2,5E-02 *(1,0E-05)*	3,4E-07 *(2,8E-08)*
	cy 4-1BB	1,2E+05 *(8,6E+03)*	1,3E-02 *(1,8E-04)*	1,1E-07 *(9,9E-09)*
	hu CD19	2,77E+04	2,67E-04	9,64E-09
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) dirigidas a CD19 (8B8-018) bivalente (construcción 3.6)	hu 4-1BB	6,9E+04 *(1,7E+03)*	2,4E-02 *(1,5E-04)*	3,5E-07 *(1,1E-08)*
	cy 4-1BB	1,1E+05 *(7,7E+03)*	1,4E-02 *(3,1E-04)*	1,3E-07 *(1,3E-08)*
	hu CD19	2,55E+04	2,69E-04	1,06E-08
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico humano (71-248) separado no dirigida de DP47 monovalente con cruce de CH-CL y con restos cargados (control D)	hu 4-1BB	7,3E+04 *(3,9E+03)*	2,6E-02 *(6,3E-04)*	3,5E-07 *(1,0E-08)*
	cy 4-1BB	1,2E+05 *(1,9E+03)*	1,4E-02 *(1,0E-04)*	1,2E-07 *(2,9E-09)*
huIgG1 PGLALA anti-CD19 (8B8-018)	hu CD19	2,12E+04	2,61E-04	1,23E-08

3.2. Resonancia de plasmón superficial (unión simultánea)

La capacidad de unión simultánea a 4-1BB Fc (kih) humano y a CD19 humano 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). Se acopló 4-1BB Fc (kih) humano biotinilado directamente a una celda de flujo de una microplaca

sensora de estreptavidina (SA). Se usaron niveles de inmovilización de hasta 250 unidades de resonancia (UR).

Las construcciones de 4-1BBL separado trimérico dirigidas a CD19 (construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 4.4) se pasaron a un intervalo de concentración de 200 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 90 segundos y la disociación se ajustó a cero s. Se inyectó CD19 humano como segundo analito con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 90 segundos a una concentración de 500 nM (**figura 34A**). La disociación se controló durante 12 s. Se corrigieron las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia, en los casos donde no se inmovilizó proteína.

Como puede observarse en las gráficas de la **figura 35**, todas las construcciones biespecíficas pudieron unirse simultáneamente a 4-1BB humano y a CD19 humano.

Ejemplo 4

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD-19

4.1. Unión de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD19 sobre PBMC humanos activados

Para determinar la unión de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de 4-1BBL a los PBMC humanos, se usaron en el ensayo diferentes títulos de concentración de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de 4-1BBL dirigidas a CD19 tal como se describe en el ejemplo 5.2.

Las figuras 36A y **36B** muestran la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 tal como se prepararon en el ejemplo 7 sobre células T CD4+ y células T CD8+ activadas que expresan 4-1BB, respectivamente. Se representaron ventanas lógicas en células T CD45+ CD3+ CD4+ o CD45+ CD3+ CD8+ vivas y se transfirió fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de fragmento Fcγ de IgG anti-IgG humana AffiniPure conjugado a MFI o a PE frente a la concentración titulada de variantes de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigido. La tabla 78 muestra los valores de CE_{50} medidos para las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 y para las moléculas de control.

Tabla 78: Unión a células T CD4+ y células T CD8+ activadas que expresan 4-1BB

Construcción	CE_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	CE_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Control B	0,05	0,26
Control C	0,02	0,30
Control D	0,04	0,28
Control E	0,13	1,22
3.1	0,03	0,28
3.3	0,01	0,29
3.4	0,15	2,04
3.5	0,04	1,03
3.6	0,05	0,21

4.2 Unión a células tumorales que expresan CD19

Para los ensayos de unión en células tumorales que expresan CD19, se usaron las siguientes líneas celulares de linfoma que expresan CD19 humano: línea celular SU-DHL-8 (DSMZ ACC573) de linfoma difuso no de Hodgkin de células B grandes (B-NHL), línea celular Nalm6 (DSMZ ACC-128) de leucemia linfoide aguda de células B precursoras, línea celular Toledo (ATCC CRL-2631) de linfoma linfoblástico difuso de células grandes y la línea celular OCI-Ly18 (DSMZ ACC-699) de linfoma difuso de células B grandes. Los ensayos se llevaron a cabo tal como se describe para las líneas celulares tumorales MV-3 y WM-266-4.

Se representaron ventanas lógicas en células tumorales vivas y se representó la IMF del fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de fragmento Fcγ anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE frente al título de concentración de construcciones de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas.

La figura 37A muestra la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 tal como se prepararon en el ejemplo 7.1 a la línea celular SU-DHL-8 de linfoma difuso no de Hodgkin de células B grandes (B-NHL) y en la **figura 37B** se presenta la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 a la línea celular Nalm6 de leucemia linfoide aguda de células B precursoras. **La figura 37C** muestra la unión de las

construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 a la línea celular Toledo de linfoma linfoblástica difusa de células grandes y la **figura 37D** muestra la unión de las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 a la línea celular OCI-Ly18 de linfoma difuso de células B grandes. **La tabla 79** muestra los valores de CE_{50} medidos para las construcciones 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 y para las moléculas de control.

Tabla 79: Unión a células tumorales que expresan CD19

Construcción	CE_{50} [nM] SU-DHL-8	CE_{50} [nM] Nalm6	CE_{50} [nM] Toledo	CE_{50} [nM] OCI-Ly18
3.1	0,64	0,43	0,29	0,29
3.3	0,15	0,14	0,10	0,09
3.4	0,31	0,39	0,29	0,26
3.5	0,54	0,43	0,27	0,31
3.6	0,14	0,12	0,09	0,10
control G	0,09	0,10	0,06	0,07

Ejemplo 5

Actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD19

5.1. Activación de NF-κB en células HeLa que expresan 4-1BB humano

Se generaron células HeLa que expresaban 4-1BB humano y NF-κB-luciferasa tal como se describe en el ejemplo 6.1.

Activación de NF-κB en células Hela que expresan 4-1BB humano cultivadas conjuntamente con células tumorales que expresan CD19

Se recogieron células HeLa NF-κB-luciferasa 4-1BB humano y se resuspendieron en medio DMEM suministrado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-I al 1 % (v/v) a una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml. Se transfirieron 100 µl (2 x 10^4 células) de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos estéril de cultivo tisular de color blanco de fondo plano con tapa (Greiner bio-one, n.º de cat. 655083) y las placas se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5 % durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 50 µl de medio que contenía concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando

de 4-1BB dirigidas a CD19 (trímero de 4-1BBL separado de CD19) o de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB no dirigidas de DP47 (trímero de 4-1BBL separado de DP47). Se resuspendieron líneas celulares de linfoma de células B que expresan CD19 (línea celular SU-DHL-8 (DSMZ ACC573) de linfoma difuso no de Hodgkin de células B grandes y la línea celular Pfeiffer (ATCC CRL-2632) humana de linfoma de células B no de Hodgkin) en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-I al 1 % (v/v) a una concentración de 2 x 10^6 células/ml.

Una suspensión de células de linfoma de células B que expresan CD19 (50 µl, relación final de 1:5) o solo de medio se añadieron a cada pocillo y se incubaron las placas durante 6 horas a 37 °C y CO_2 al 5 %. Las células se lavaron dos veces con 200 µl/pocillo de DPBS. 40 µl de tampón indicador de lisis recién preparado (Promega, n.º de cat. E3971) se añadieron a cada pocillo y la placa se almacenó durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente la placa y el tampón de detección congelados (sistema de ensayo Luciferase 1000, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de tampón de detección a cada pocillo y se midió la actividad de luciferasa tan rápido como fue posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y el programa informático SoftMax Pro (Molecular Devices) contando la emisión de luz en ULL (unidades de luz liberada durante 0,5 s/pocillo) o un lector de placas contador multimarcador Victor3 1420 (Perkin Elmer) y el programa informático Perkin Elmer 2030 Manager que cuenta la emisión de luz como cuentas por segundo (CPS) y se representó frente a la concentración de las construcciones ensayadas.

Las construcciones 3.1 y 3.3 de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD19 desencadenaron la señalización de la ruta de NF-kB en la línea celular indicadora en presencia de células de linfoma de células B que expresan CD19. Por el contrario, las moléculas de control no dirigidas no lograron desencadenar dicho efecto a ninguna de las concentraciones ensayadas (figura 38).

Ejemplo 6

6.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CEA (T84.66-LCHA)

6.1.1 Humanización del clon T84.66 anti-CEA

Se desarrollaron nuevas variantes humanizadas del anticuerpo murino T84.66

(Wagener et al., J Immunol 130, 2308 (1983), Neumaier et al., J Immunol 135, 3604 (1985)) mediante injerto de las CDR en secuencias aceptoras de armazón de línea germinal humanas.

La humanización del anticuerpo a partir de un origen no humano consiste esencialmente en el trasplante de los restos de las CDR desde el anticuerpo no humano (donante) al armazón de un anticuerpo humano (aceptor). Normalmente, el armazón aceptor se selecciona 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 del armazón aceptor de anticuerpo se llevó a cabo alineando la secuencia de la proteína T84.66 de ratón (n.º de ref. NCBI: CAA36980 para la cadena pesada (SEC ID Nº: 317), y CAA36979 (SEC ID Nº: 318) para la cadena ligera) con una colección de secuencias de línea germinal humana y seleccionando aquella secuencia humana que mostrase una elevada identidad de secuencia. En este caso se seleccionó la secuencia IGHV1-69*08 de la base de datos IMGT como secuencia de armazón aceptor de cadena pesada (n.º de ref. IMGT Z14309, SEC ID Nº: 319), y se seleccionó la secuencia IGKV3-11*01 (n.º de ref. IMGT X01668, SEC ID Nº: 320) para que fuese el armazón aceptor para la cadena ligera. Sobre estos dos armazones aceptores, se injertaron las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los dominios variables ligero y pesado de ratón. Ya que la región marco conservada 4 (FR4) no es parte de la región variable del gen V de línea germinal, el alineamiento para esa posición se efectuó individualmente. Se seleccionó la secuencia JH4 para la cadena pesada, y se seleccionó la secuencia JK2 para la cadena ligera.

6.1.2 Unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 a células

Se ensayó la unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 en células de adenocarcinoma gástrico humano que expresan CEA (MKN45, DSMZ ACC 409).

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 una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones crecientes de IgG de CEA (4 ng/ml– 60 μg/ml), se lavaron dos veces con PSB frío con BSA al 0,1 %, se volvieron a incubar durante 30 min

adicionales a 4 °C con 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), se lavaron dos veces con PBS frío con BSA al 0,1 % y se analizaron inmediatamente mediante FACS usando un FACS CantoII (programa informático FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron y calcularon usando GraphPadPrism5.

La figura 39 muestra los diferentes patrones de unión de las variantes humanizadas seleccionadas de la IgG T84.66 a CEA humano, expresado en células MKN45. Basándose en los valores de unión de CE50 calculados (**tabla 80**), se seleccionó la variante 1 para su posterior evaluación.

Tabla 80: Unión de diferentes variantes humanizadas de IgG T84.66 a células (valores de CE50. basados en las curvas de unión mostradas en la Figura 39, calculadas con Graph Pad Prism).

	CE50 (µg/ml)
T84.66 quimérico progenitor	0,99
Variante humanizada 1	1,5
Variante humanizada 2	8,6
Variante humanizada 3	1,4
Variante humanizada 4	3,1
Variante humanizada 5	-
Variante humanizada 6	-

La variante humanizada 1 se denomina en lo sucesivo T84.66-LCHA. Las secuencias de aminoácidos de sus CRD y de las secuencias de VH y VL así como de las de aminoácidos de los dominios VH y VL del clon quimérico progenitor T84.66 se muestran en la tabla 81.

Tabla 81: Secuencias de aminoácidos de los dominios variables del clon T84.66-LCHA de CEA y su anticuerpo progenitor T84.66

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº:
CEA CDR-H1	DTYMH	321
CEA CDR-H2	RIDPANGNSKYVPKFQG	322
CEA CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	323

Descripción	Secuencia	SEC ID Nº:
CEA CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	324
CEA CDR-L2	RASNRAT	325
CEA CDR-L3	QQTNEDPYT	326
VH de unión a CEA progenitora	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMH WVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATIT ADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDYA MAYWGQGTSVTVSS	327
VL de unión a CEA progenitora	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGF LHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPVRFSGTGSR TDFTLIIDPVEADDVATYYCQQTNEDPYTFGGGTKLE IK	328
VH de unión a CEA humanizado (T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMH WVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTI TADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDY AMAYWGQGTLVTVSS	329
VL de unión a CEA humanizado (T84.66-LCHA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFL HWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLE IK	330

6.2 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CEA (T84.66-LCHA)

Se sintetizaron diferentes fragmentos de la secuencia de ADN codificante de parte del ectodominio (aminoácidos 71-254 y 71-248) del ligando 4-1BB humano de acuerdo con la secuencia P41273 de la base de datos UniProt (SEC ID Nº: 42).

6.2.1 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a CEA (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados (construcción 5.1)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, tal como se ilustra en la **figura 29A**: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y

fusionado al dominio CH de IgG1 humana, tal como se describe en la figura 29 B: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH humano.

Para mejorar el emparejamiento correcto se han introducido las siguientes mutaciones en los CH-CL cruzados. En el ligando de 4-1BB dimérico fusionado a CL humano, E123R y Q124K. En el ligando de 4-1BB monomérico fusionado a CH1 humano, K147E y K213E.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66-LCHA, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831.

La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CEA-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CEA ensamblados (**figura 40**, construcción 5.1).

La tabla 82 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente con CH-CL cruzados y restos cargados (construcción 5.1).

Tabla 82: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 5.1). * para restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia nucleotídica de hu 4-1BBL dimérico (71-254) – CL*	véase la Tabla 3

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	cadena de Fc pomo	
130	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
331	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACAG GGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGC CAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCA GGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCA CCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGC GGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC CCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATG GCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTT CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGT ATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
332	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena ligera	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACCCT GTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACCCTGA GCTGTAGAGCCGGCGAGAGCGTGGACATCTTC GGCGTGGGATTTCTGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCTACAG AGCCAGCAACCGGGCCACAGGCATCCCCGCCA GATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCA CCCTGACAATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGAC TTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGACCAACGAG GACCCCTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCT GGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC CCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGT

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
115	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
116	hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
333	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQG RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGY YVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
334	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGF LHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

6.2.2 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a CEA (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados sin restos cargados (construcción 5.2)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29A), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CL: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al dominio CH1 de IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29 B), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CH1: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH1 humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66-LCHA**,** se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana.

Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CEA-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CEA ensamblados (**figura 40**, construcción 5.2).

La tabla 83 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente que contiene CH-CL cruzados sin restos cargados (construcción 5.2).

Tabla 83: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin restos cargados (construcción 5.2).

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia

165	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-254) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 22
166	Secuencia nucleotídica de hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1	véase la Tabla 22
331	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 82
332	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82
117	Ligando dimérico (71-254) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 22
118	Ligando monomérico (71-254) – CH1	véase la Tabla 22
333	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 82
334	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82

6.2.3 Preparación de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigido a CEA (T84.66-LCHA) bivalente

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separados por enlazadores $(G4S)_2$ al extremo C-terminal de la cadena de Fc de agujero de IgG1 humana, tal como se ilustra en la figura 29C: Fc de agujero de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano. Un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo de IgG1 humana, tal como se describe en la figura 29D: Fc pomo de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66-LCHA, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero, con el pomo

o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico de agujero de huIgG1 anti-CEA que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de ligando monomérico de pomo de huIgG1 anti-CEA que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CEA (figura 40).

La tabla 84 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) bivalente.

Tabla 84: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) PGLALA de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) bivalente (construcción 5.3)

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
335	Secuencia nucleotídica anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de 4-BBL dimérico de Fc agujero (71-254)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTG AAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTAC ATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGCCAAC GGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGC AGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCC ACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTC GGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATT GGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT*G* *CTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGG* *CCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA* *GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC* *CCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGA* *GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCC* *GTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGC* *AGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGC* *ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGC
		CCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCAC
		CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT
		CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC
		CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG
		CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
		GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
		GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
		GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
		CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
		CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
		CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
		AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTG
		CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
		GAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGG
		CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
		GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
		CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
		CTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
		CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
		CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
		GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGG
		CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG
		GCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC
		TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGC
		TGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC
		CCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG
		GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAG
		AGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG
		GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCG
		GAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGT
		GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAG
		CGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGT
		GGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAA
		TAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCT GCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTT CAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCC TTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGG CGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTC CCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAG ACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAA TGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTAC TCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACT GGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAAC TGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTT TTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGG GGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCA TCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGC TGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGC CTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTT CCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACA GCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAG AGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGC AACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGA A
336	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) Fc pomo monomérico 41-BBL (71-254)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTG AAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTAC ATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACAGGGA CTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGCCAAC GGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGC AGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCC ACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTC GGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATT GGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT*G CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG
		CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
		CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG
		CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG
		TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
		CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
		CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
		AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
		AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGT
		GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG
		TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT
		CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT
		GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
		CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
		GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
		GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
		CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
		GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
		CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
		CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
		CCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAA
		CCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTT
		CTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
		CAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCAC
		CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT
		CCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCG
		GTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGT
		GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA
		GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCG
		GCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGC
		CCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTG
		CTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTG
		GTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCC
		CTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGC
		GTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGC GTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGA GAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCG CTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATA GCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGC ACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGC TGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCA GAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTT CTCCAAGAAGCGAA
332	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82
337	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de 4-1BBL dimérico de Fc agujero (71-254)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMH WVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRV TITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVS DYAMAYWGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG*

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
338	cadena anti-CEA (T84.66-LCHA) Fc pomo 4-1BBL (71-254) monomérico	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMH WVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRV TITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVS DYAMAYWGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSPRSE*
334	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82

6.2.4 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a CEA (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, en analogía al ilustrado en la Figura 29A: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-248) y fusionado al dominio CH de IgG1 humana, en analogía al descrito en la Figura 29B: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH humano.

Se subclonó el polipéptido que codifica al ligando 4-1BB fusionado al dominio CL en fase con los dominios CH2 y CH3 de cadena pesada de IgG1 humana en el pomo (Merchant, Zhu et al. 1998). Para mejorar el emparejamiento correcto se han introducido las siguientes mutaciones en los CH-CL cruzados. En el ligando de 4-1BB dimérico fusionado a CL humano, E123R y Q124K. En el ligando de 4-1BB monomérico fusionado a CH1 humano, K147E y K213E.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66-LCHA, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-cadena Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CD19-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CEA ensamblados (**figura 40**).

La tabla 85 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente con CH-CL cruzados y restos cargados.

Tabla 85: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 5.4). * restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
169	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-248) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 24
170	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-248) – CH1*	véase la Tabla 24
331	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 82
332	Secuencia nucleotídica anti-CEA(T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82
119	Ligando dimérico (71-248) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 24
120	Ligando monomérico (71-248) – CH1*	véase la Tabla 24
333	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 62
334	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 59

6.2.5 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigida a CEA (T84.66-LCHA) con dominios CH1-CL cruzados sin restos cargados (construcción 5.5)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29A), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CL: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-248) y fusionado al dominio CH1 de IgG1 humana, en analogía a lo ilustrado en la figura (29 B), pero sin mutaciones de aminoácidos en el dominio CH1: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH1 humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que

codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66-LCHA**,** se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CEA-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CD19 ensamblados (figura 40).

La tabla 86 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente que contiene CH-CL cruzados sin restos cargados.

Tabla 86: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) monovalente que contiene cruce de CH-CL sin restos cargados.

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
171	Secuencia nucleotídica de ligando dimérico (71-248) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 25
172	Secuencia nucleotídica ligando monomérico (71-248)-CH1	véase la Tabla 25
331	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 82
332	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82
173	Ligando dimérico (71-248) – CL cadena de Fc pomo	véase la Tabla 25

174	Ligando monomérico (71-248) – CH1	véase la Tabla 25
333	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de Fc agujero	véase la Tabla 82
334	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82

6.2.6 Preparación de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-248) dirigido a CEA (T84.66-LCHA) bivalente (construcción 5.6)

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-248), separados por enlazadores $(G4S)_2$ al extremo C-terminal de la cadena de Fc de agujero de IgG1 humana, tal como se ilustra en la **figura 29C**: Fc de agujero de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano. Un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo de IgG1 humana, tal como se describe en la **figura 29D**: Fc pomo de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66-LCHA, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero, con el pomo o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico de agujero de huIgG1 anti-CEA que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de ligando monomérico de pomo de huIgG1 anti-CEA que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico ensamblado y dos Fab de unión a CEA (figura 40).

La tabla 87 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) bivalente.

Tabla 87: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigido a CEA (T84.66-LCHA) bivalente

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
339	Secuencia nucleotídica anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de 4-BBL dimérico de Fc agujero (71-248)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACAG GGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGC CAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCA GGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCA CCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGC GGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC CCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATG GCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTT CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTA TAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTC GTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGG AGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCC CTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGC AGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACG TGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACA GCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAG GCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAC TGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGT TCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCG CTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGG TTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGC CAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGC CAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGG GCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGA TCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGA GCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGG ATCTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGG CTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGA GCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTG TCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGAT ACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTG TACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGG TGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCC CTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCA GCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAG CGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCT GAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGC ATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGC TGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTC GCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
340	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66-LCHA) de cadena de Fc pomo de 4-BBL (71-248) monomérico	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACAG GGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGC CAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCA GGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAGCA CCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGC GGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC CCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATG GCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGT GTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTG TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGA ACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGA CCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAG GAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCT GATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCA GGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGT GCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAG CGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCG CTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGG TTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGC CAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGC CAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGG GCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCTGCCGGGCTC
332	Secuencia nucleotídica anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena ligera	véase la Tabla 82

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
341	anti- CEA (T84.66-LCHA) cadena de 4-1BBL dimérico de Fc agujero (71-248)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA GL
342	cadena anti-CEA (T84.66-LCHA) Fc pomo 4-1BBL (71-248) monomérico	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGR VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
334	anti-CD19(8B8-018) cadena ligera	véase la Tabla 82

6.2.7 Preparación de molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigida a CEA (T84.66) con dominios CH1-CL cruzados con restos cargados

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separado mediante enlazadores $(G4S)_2$, y fusionado al dominio CL de IgG1 humana, tal como se ilustra en la figura 29 A: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CL humano. Se clonó un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al dominio CH de IgG1 humana, tal como se describe en la figura 29 B: ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, CH humano.

Para mejorar el emparejamiento correcto se han introducido las siguientes mutaciones en los CH-CL cruzados. En el ligando de 4-1BB dimérico fusionado a CL humano, E123R y Q124K. En el ligando de 4-1BB monomérico fusionado a CH1 humano, K147E y K213E.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66, se subclonaron en fase bien con la cadena pesada constante del agujero o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el

documento WO 2012/130831.

La combinación de la cadena de ligando dimérico-Fc pomo que contiene las mutaciones S354C/T366W, la fusión de CH1 monomérico, la cadena dirigida anti-CD19-cadena de Fc de agujeros que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V y la cadena ligera anti-CD19 permite la generación de un heterodímero que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y un Fab de unión a CEA ensamblados, mostrada en la **figura 40**.

La tabla 88 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66) monovalente con CH-CL cruzados y restos cargados.

Tabla 88: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de fusión de Fc (kih de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados. * para restos cargados

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
129	Secuencia nucleotídica de hu 4-1BBL dimérico (71-254) – CL* cadena de Fc pomo	véase la Tabla 3
130	Secuencia nucleotídica hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
343	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66) cadena de Fc agujero	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGA ACTGGTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCT GAGCTGTACCGCCAGCGGCTTCAACATCAA GGACACCTACATGCACTGGGTCAAGCAGCG GCCTGAGCAGGGCCTGGAATGGATCGGCA GAATCGACCCCGCCAACGGCAACAGCAAAT ACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		TCACCGCCGACACCAGCAGCAACACAGCCT ACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCCTTCG GCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCT ATTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGT CCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCA GCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACC GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTG GTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT CTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
344	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66) cadena ligera	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCTCT CTGGCCGTGTCTCTGGGACAGAGGGCCACC ATGTCTTGCAGAGCCGGCGAGAGCGTGGAC ATCTTCGGCGTGGGATTTCTGCACTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCCAAGCTG CTGATCTACAGAGCCAGCAACCTGGAAAGC GGCATCCCCGTGCGGTTTAGCGGCACCGG CAGCAGAACCGACTTCACCCTGATCATCGA CCCCGTGGAAGCCGACGACGTGGCCACCTA CTACTGCCAGCAGACCAACGAGGACCCCTA CACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAAT CAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGA CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
115	hu 4-1BBL dimérico (71-254)-CL* Fc de cadena de pomo	véase la Tabla 3
116	hu 4-1BBL monomérico (71-254) – CH1*	véase la Tabla 3
345	anti- CEA (T84.66) cadena de Fc	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDT YMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPK

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
	agujero	FQGKATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYC APFGYYVSDYAMAYWGQGTSVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
346	anti- CEA (T84.66) cadena ligera	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIF GVGFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPV RFSGTGSRTDFTLIIDPVEADDVATYYCQQTN EDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

6.2.8 Preparación molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que contiene trímero de ligando de 4-1BB (71-254) dirigido a CEA (T84.66) bivalente

Se clonó un polipéptido que contiene dos ectodominios de ligando de 4-1BB (71-254), separados por enlazadores $(G4S)_2$ al extremo C-terminal de la cadena de Fc de agujero de IgG1 humana, tal como se ilustra en la figura 29C: Fc de agujero de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano. Un polipéptido que contiene un ectodominio de ligando de 4-1BB (71-254) y fusionado al extremo C-terminal de la cadena Fc pomo de IgG1 humana, tal como se describe en la figura 29D: Fc pomo de IgG1 humana, conector $(G4S)_2$, ligando de 4-1BB humano.

Las secuencias de ADN de la región variable de cadena pesada y ligera que codifican una molécula de unión específica para CEA, clon T84.66, se subclonaron

en fase bien con la cadena pesada constante del agujero, con el pomo o con la cadena ligera constante de IgG1 humana. Las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala se han introducido en la región constante de las cadenas de pomos y agujeros para abrogar la unión a receptores de Fc gamma de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2012/130831. La combinación de la cadena de ligando dimérico de agujero de huIgG1 anti-CEA que contiene las mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V, la cadena de ligando monomérico de pomo de huIgG1 anti-CEA que contiene las mutaciones S354C/T366W y la cadena ligera anti-CEA permite la generación de un heterodímero, que incluye un ligando de 4-1BB trimérico y dos Fab de unión a CEA ensamblados, mostrada en la **figura 40**.

La tabla 89 muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66) bivalente.

Tabla 89: Secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) PGLALA de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigido a CEA (T84.66) bivalente

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
347	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66) cadena de 4-BBL dimérico de Fc agujero (71-254)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTG GTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTA CCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACAT GCACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGAGCAGGGCCT GGAATGGATCGGCAGAATCGACCCCGCCAACGG CAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAAG GCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCAACACA GCCTACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCCTTCGGCT ACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGG CCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCCTCTGCTAG CACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCC CAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGC TCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTG ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGG TCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGAC

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAG GAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCG ATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCT GCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGC CTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCA GCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAG CCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTG GCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAG

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		GCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGG AGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACA CGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCT GGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGC CGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGG CGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACC CGAACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCT GGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGT GGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTG AGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTG TCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATA CAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTA CTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTG GTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTG GCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTG GCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGC CACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTT CGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGC CGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAA GCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAG GGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACA CCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGAT CAGAA
348	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66) cadena de 4-BBL monomérico de Fc pomo (72-254)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACTG GTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGTA CCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACAT GCACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGAGCAGGGCCT GGAATGGATCGGCAGAATCGACCCCGCCAACGG CAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAAG GCCACCATCACCGCCGACACCAGCAGCAACACA GCCTACCTGCAGCTGACCAGCCTGACCTCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCCTTCGGCT ACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGG CCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCCTCTGCTAG CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA CCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT GTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCA GAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTG GTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAG AACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGAC CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGC CCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGG ATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGA TCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCAT GTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTG ATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTG GACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGC

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		CAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTG GAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCT GGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTC TGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCAC TGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGC CCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTG CATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCC TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGC CTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCC TGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
344	Secuencia nucleotídica anti-CEA (T84.66) cadena ligera	véase la Tabla 88
349	anti- CEA (T84.66) cadena de 4-1BBL dimérico de Fc agujero (71-254)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMH WVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDY AMAYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGL LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS

SEC ID Nº:	Descripción	Secuencia
		LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
350	cadena anti-CEA (T84.66) Fc pomo 4-1BBL (71-254) monomérico	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMH WVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYYVSDY AMAYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSPRSE
346	anti- CEA (T84.66) cadena ligera	véase la Tabla 88

6.3 Preparación de moléculas de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado no dirigida e IgG humana como moléculas de control

6.3.1 Preparación de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB humano no dirigidas (moléculas de control)

Estas moléculas de control se prepararon tal como se describe anteriormente para la construcción 3.1 dirigida a CEA (denominada control B), 3.3 (denominada

control C), 3.4 (denominada control D) y 3.5 (denominada control E) con la única diferencia que la molécula de unión anti-CD19 (VH-VL) se reemplazó por un control de línea germinal, denominado DP47, sin unión al antígeno (véase la figura 40). Las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control B, la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado no dirigido de DP47 monovalente que contenía CH-CL cruzados con restos cargados, se muestran en la **tabla 68** anterior (véase el ejemplo 7.3.1). **La tabla 69** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado no dirigido de DP47 bivalente, control C. **La tabla 70** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente que contenía CH-CL cruzados con restos cargados, control D. **La tabla 71** muestra las secuencias de ADNc y de aminoácidos de la fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado no dirigido de DP47 monovalente sin restos cargados en el cruce CH-CL, control E.

6.3.2 Anticuerpos como moléculas de control

Un control adicional usado en los ensayos fue una IgG1 humana de control de línea germinal de DP47 no dirigida denominada control F, que contenía las mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala, para abrogar la unión a receptores de Fc gamma. Las secuencias de ADNc y de aminoácidos del control F pueden encontrarse en la **tabla 73** anterior.

6.4 Producción de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas a CEA y sus moléculas de control

Las secuencias que codifican la molécula de unión a antígeno de fusión de F (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigida y no dirigida se clonaron en un vector plasmídico que dirige la expresión de la inserción a partir de un promotor de MPSV y contiene una secuencia de poliA sintética situada en el extremo 3' del CDS. Además, el vector contiene una secuencia OriP de EBV para el mantenimiento episómico del plásmido.

La fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado se produjo cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión en mamíferos usando polietilenimina. Las células se transfectaron con los correspondientes

vectores de expresión. Para las variantes 1, 2, 4, 5 y su control B, D y E, a una relación 1:1:1:1 ("vector de ligando dimérico-CL- cadena de pomo": "vector de fusión de ligando monomérico-CH1": "vector de Fab anti-CEA-cadena de agujero": "vector anti-CEA cadena ligera"). Para la variante 3, 6 y su control C, a una relación 1:1:1 ("vector de cadena de ligando dimérico de Fc de agujero de huIgG1": "vector de cadena de ligando monomérico de Fc pomo de huIgG1": "vector anti-CEA cadena ligera"). Las IgG humanas, usadas como control en el ensayo, se produjeron como para la construcción biespecífica (para la transfección solo se usaron un vector para la cadena ligera y un vector para la cadena pesada).

Para la producción en matraces agitados de 500 ml, se sembraron 300 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 210 x g, y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión (200 µg de ADN total) se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO. Después de la adición de 540 µl de PEI, la solución se agitó vorticialmente 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 a las células 160 ml de medio Excell suplementado con L-glutamina 6 mM, PEPSOY 5 g/l y ácido valproico 1,2 mM y se cultivaron las células durante 24 horas. Un día después de la transfección se añadió alimentación al 12 % (aminoácidos y glucosa). Después de cultivar durante 7 días, se recogió el sobrenadante mediante centrifugación durante 30-40 minutos a al menos 400 x 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.

La fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado, así como la IgG, se purificó 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 MabSelect Sure (VC = 5-15 ml, resina de GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio (20 mM), tampón de citrato de sodio (20 mM) (pH 7,5). La proteína no unida se eliminó mediante lavado con al menos 6 volúmenes de columna del mismo tampón. La proteína unida se eluyó usando bien un gradiente lineal (20 VC) o una elución por etapas (8 VC) con citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de glicina 100 mM (pH 3,0). Para el gradiente lineal se añadió una etapa adicional de elución de 4 volúmenes de columna.

El pH de las fracciones recogidas se ajustó añadiendo 1/10 (v/v) de fosfato de sodio 0,5 M, pH8.0. La proteína se concentró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, solución de Tween20 al 0,01 % (v/v) de pH 6,0.

La concentración proteica se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y peso molecular de la molécula de unión a antígeno de fusión de Fc(kih) de ligando de 4-1BB trimérico dirigida se analizó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con SimpleBlue™ SafeStain de Coomasie (Invitrogen, EE.UU.) o CE-SDS usando un dispositivo Caliper LabChip GXII (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.

La tabla 90 resume el rendimiento y contenido final de monómero de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigida a CEA.

Tabla 90: Análisis bioquímico de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigida a CEA

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
molécula de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) separado dirigida a CEA (T84.66-LCHA) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción 5.4)	98	1,4
fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-248) dirigidas a CEA (T84.66-LCHA) bivalente (construcción 5.6)	98	0,4
molécula de unión a antígeno de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) separado dirigida a CEA (T84.66) monovalente que contiene cruce de CH-CL con restos cargados (construcción	97	15

5.7)		
fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico (71-254) dirigidas a CEA (T84.66) bivalente (construcción 5.8)	96	2

La tabla 91 resume el rendimiento y contenido final de monómero de las moléculas de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado de DP47 no dirigidas, tanto monovalentes (control B, D y E) como bivalentes (control C), y de la IgG1 PGLALA humana de DP47 de línea germinal (control F).

Tabla 91: Análisis bioquímico de fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB trimérico separado no dirigida de DP47

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 monovalente (control B)	99	15,4
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 bivalente (control C)	98	12,6
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 monovalente (control D)	99,5	25,9
fusión de Fc (kih) de ligando de 4-1BB humano trimérico (71-254) separado no dirigida de DP47 monovalente (control E)	93,3	4,1
IgG1 PGLALA humana de DP47 de línea germinal	100	50

Ejemplo 7

Caracterización funcional de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CEA

7.1 Resonancia de plasmón superficial (unión simultánea)

Producción de hu NA3B3A2 como antígeno para construcciones de 4-1BBL separado trimérico dirigidas a CEA

El antígeno seleccionado para evaluar la unión a CEA mediante SPR fue una molécula híbrida compuesta de dominios A3 y B3 de CEACAM5 (CEA) humano y dominios N y A2 de CEACAM1 (BGP1) humano de manera similar a lo que se ha descrito para NABA (Durbin H. et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 10 de mayo de 1994;91(10):4313-7). El antígeno se denomina en el presente documento NA3B3A2 y puede encontrarse una descripción esquemática en la **figura 41A.**

La tabla 92 muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de hu NA3B3A2-avi-His.

Tabla 92: Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de hu NA3B3A2-avi-His

SEC ID Nº:	**Antígeno**	**Secuencia**
351	Secuencia nucleotídica hu NA3B3A2-avi His	CAGCTGACCACCGAGTCCATGCCCTTCAACGTG GCCGAGGGCAAAGAGGTGCTGCTGCTGGTCCA CAACCTGCCCCAGCAGCTGTTCGGCTACAGCTG GTACAAGGGCGAGCGGGTGGACGGCAACCGGC AGATCGTGGGCTACGCCATCGGCACCCAGCAGG CCACACCCGGCCCTGCCAATAGCGGCAGAGAGA CAATCTACCCCAACGCCAGCCTGCTGATCCAGA ACGTGACCCAGAACGACACCGGCTTCTACACAC TCCAAGTCATCAAGAGCGACCTGGTCAACGAGG AAGCCACCGGCCAGTTCCACGTGTACCCCGAGC TGCCCAAGCCCAGCATCAGCAGCAACAACAGCA AGCCCGTGGAAGATAAGGACGCCGTGGCCTTTA CCTGCGAGCCCGAGGCCCAGAACACCACCTACC TGTGGTGGGTCAACGGCCAGAGCCTGCCCGTGT CCCCCAGACTCCAGCTGAGCAACGGCAACAGAA CCCTGACCCTGTTCAACGTGACCCGGAATGACG CCAGAGCCTACGTGTGCGGCATCCAGAACAGCG TGTCCGCCAACCGCAGCGACCCCGTGACCCTGG ATGTGCTGTACGGCCCCGACACCCCCATCATCA GCCCCCCTGACAGCAGCTACCTGAGCGGCGCC AACCTGAACCTGAGCTGCCACAGCGCCAGCAAC CCCAGCCCTCAGTACAGCTGGCGGATCAACGGC ATCCCCCAGCAGCACACCCAGGTGCTGTTTATC GCCAAGATCACCCCCAACAACAACGGCACCTAC

SEC ID Nº:	**Antígeno**	**Secuencia**
		GCCTGCTTCGTGTCCAACCTGGCCACCGGCCGG AACAACAGCATCGTGAAGTCCATCACCGTGTCC GCCTCCCTGAGCCCCGTGGTGGCCAAGCCTCAG ATCAAGGCCAGCAAGACCACCGTGACCGGCGAC AAGGACAGCGTGAACCTGACCTGCTCCACCAAC GATACCGGCATCAGCATCCGGTGGTTCTTCAAG AATCAGTCCCTGCCCAGCAGCGAGCGGATGAAG CTGAGCCAGGGCAACATCACCCTGTCCATCAAC CCCGTGAAAAGAGAGGACGCCGGCACCTATTGG TGCGAGGTGTTCAACCCCATCAGCAAGAACCAG AGCGACCCCATCATGCTGAACGTGAACTACAAC GCCCTGCCCCAAGAAAACCTGATCAATGTTGATC TGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCAGGCAGCGGC CTGAACGACATCTTCGAAGCCCAGAAAATCGAGT GGCACGAGGCCAGAGCCCACCACCACCATCACC AC
352	NA3B3A2 humano -avi-His	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYK GERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPN ASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHV YPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTT YLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRND ARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPP DSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQH TQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSIT VSASLSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTN DTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNITLSINPVK REDAGTYWCEVFNPISKNQSDPIMLNVNYNALPQE NLINVDLEVLFQGPGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHH HHHH

La producción de proteína se llevó a cabo tal como se describió anteriormente para la proteína de fusión de Fc (ejemplo 2.1.1). Las proteínas secretadas se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía quelante, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. La primera etapa cromatográfica se llevó a cabo en un cartucho NiNTA Superflow (5 ml, Qiagen) se

equilibraron en fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, pH7.4. La elución se llevó a cabo aplicando un gradiente sobre 12 volúmenes de columna del 5 % al 45 % de tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 nM, imidazol 500 mM, pH 7,4).

La proteína se concentró y filtró antes de cargarla en una columna HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 6,0. **La tabla 93** resume el rendimiento y contenido final de monómero de NA3B3A2-avi-His humano.

Tabla 93: Análisis bioquímico de NA3B3A2-avi-His humano

Construcción	Monómero [%] (SEC)	Rendimiento [mg/l]
NA3B3A2 humano -avi-His	88	14,1

La capacidad de unión simultánea a 4-1BB Fc (kih) humano y a NA3B3A2 humano 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). Se acopló 4-1BB Fc (kih) humano biotinilado directamente a una celda de flujo de una microplaca sensora de estreptavidina (SA). Se usaron niveles de inmovilización de hasta 250 unidades de resonancia (UR).

Las construcciones de 4-1BBL trimérico separado dirigidas a CEA (construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8) se pasaron a un intervalo de concentración de 200 nM con un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 90 y la disociación se ajustó a ceo segundos. Se inyectó NA3B3A2 humano como segundo analito a un caudal de 30 µl/minuto a través de las celdas de flujo durante 90 segundos a una concentración de 500 nM (**figura 41B**). La disociación se controló durante 120 segundos. Se corrigen las diferencias del índice refractivo en bruto restando la respuesta obtenida en una celda de flujo de referencia, en los casos donde no se inmovilizó proteína.

Como puede observarse en las gráficas de la **figura 42**, todas las construcciones biespecíficas pudieron unirse simultáneamente a 4-1BB humano y a NA3B3A2 humano.

7.2. Unión de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc (kih) que

contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CEA sobre PBMC humanos activados

Para determinar la unión de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de 4-1BBL a los PBMC humanos, se usaron en el ensayo diferentes títulos de concentración de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de 4-1BBL dirigidas a CEA tal como se describe en el ejemplo 5.2.

La figura 43 muestra la unión de las construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 tal como se prepararon en el ejemplo 11 sobre células T CD4+ y células T CD8+ activadas que expresan 4-1BB, respectivamente. Se representaron ventanas lógicas en células T CD45+ CD3+ CD4+ o CD45+ CD3+ CD8+ vivas y se representó la IMG del fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de fragmento Fcγ anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE frente al título de concentración de construcciones de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas. **La tabla 94** muestra los valores de CE_{50} medidos para las construcciones 5.4, 5.6, 5.7 y 5.8 y moléculas de control.

Tabla 94: Unión a células T CD4+ y células T CD8+ activadas que expresan 4-1BB

Construcción	CE_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	CE_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Control B	0,05	0,26
Control C	0,02	0,30
Control D	0,04	0,28
Control E	0,13	1,22
5.4	0,13	0,35
5.6	0,06	0,34
5.7	0,0004	0,36
5.8	0,17	0,38

7.2 Unión a células tumorales que expresan CEA

Para los ensayos de unión en células tumorales que expresan CEA, se usaron

las siguientes líneas celulares de linfoma que expresan CEA humano: Líneas celulares de tumores que expresan CEA, línea celular MKN-45 de cáncer gástrico humano (ATCC TCP-1008) y línea celular LS180 de adenocarcinoma colorrectal humano (ATCC CL-187). Los ensayos se llevaron a cabo tal como se describe para las líneas celulares tumorales MV-3 y WM-266-4 .

Se representaron ventanas lógicas en células tumorales vivas y se representó la IMF del fragmento $F(ab')_2$ de cabra específico de fragmento Fcγ anti-IgG humana AffiniPure conjugado a PE frente al título de concentración de construcciones de fusión de Fc de ligando de 4-1BB trimérico separado dirigidas.

La figura 44 muestra la unión de las construcciones 5.7 tal como se prepararon en el ejemplo 11.2.7 a la línea celular MKN-45 de cáncer gástrico humano (a la izquierda) y a la línea celular LS180 de adenocarcinoma colorrectal humano (a la derecha) que expresan CEA. **La tabla 95** muestra los valores de CE_{50} medidos para la línea celular MKN-45 gástrica humana que expresa CEA.

Tabla 95: Unión a células tumorales que expresan CEA

Construcción	CE_{50} [nM] MKN45-8	CE_{50} [nM] LS180
5.7	11,6	14,4

Ejemplo 8

Actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CEA

8.1. Activación de NF-κB en células HeLa que expresan 4-1BB humano

Se generaron células HeLa que expresaban 4-1BB humano y NF-κB-luciferasa.

Activación de NF-κB en células Hela que expresan 4-1BB humano cultivadas conjuntamente con células tumorales que expresan CEA humano

Se recogieron células HeLa NF-κB-luciferasa 4-1BB humano y se resuspendieron en medio DMEM suministrado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-I al 1 % (v/v) a una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml. Se transfirieron 100 µl (2 x 10^4

células) de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos estéril de cultivo tisular de color blanco de fondo plano con tapa (Greiner bio-one, n.º de cat. 655083) y las placas se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5 % durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 50 µl de medio que contenía concentraciones tituladas de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CEA (trímero de 4-1BBL separado de CEA) o de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB no dirigidas de DP47 (trímero de 4-1BBL separado de DP47). Se suspendió la línea celular MKN-45 de tumor gástrico humano (ATCC TCP-1008) que expresa CEA en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v) y GlutaMAX-I al 1 % (v/v) a una concentración de 2 x 10^6 células/ml.

Una suspensión de células de linfoma de células B que expresan CEA (50 µl, relación final de 1:5) o solo de medio se añadieron a cada pocillo y se incubaron las placas durante 6 horas a 37 °C y CO_2 al 5 %. Las células se lavaron dos veces con 200 µl/pocillo de DPBS. 40 µl de tampón indicador de lisis recién preparado (Promega, n.º de cat. E3971) se añadieron a cada pocillo y la placa se almacenó durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente la placa y el tampón de detección congelados (sistema de ensayo Luciferase 1000, Promega, n.º de cat. E4550) se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de tampón de detección a cada pocillo y se midió la actividad de luciferasa tan rápido como fue posible usando un lector de microplacas SpectraMax M5/M5e y el programa informático SoftMax Pro (Molecular Devices) contando la emisión de luz en ULL (unidades de luz liberada durante 0,5 s/pocillo) o un lector de placas contador multimarcador Victor3 1420 (Perkin Elmer) y el programa informático Perkin Elmer 2030 Manager que cuenta la emisión de luz como cuentas por segundo (CPS) y se representó frente a la concentración de las construcciones ensayadas.

Las construcciones de moléculas de unión a antígeno de fusión de Fc que contienen trímero de ligando de 4-1BB dirigidas a CD19 desencadenaron la señalización de la ruta de NF-kB en la línea celular indicadora en presencia de células de la línea celular MKN-45 de cáncer gástrico humano. Por el contrario, las moléculas de control no dirigidas no lograron desencadenar dicho efecto a ninguna de las concentraciones ensayadas (figura 45). La tabla 96 muestra los valores de CE_{50} correspondientes.

Tabla 96: Unión a células tumorales que expresan CEA

Construcción	CE_{50} [nM] MKN-45 sin células tumorales	CE_{50} [nM] MKN45
5.4	3,1	0,34
5.6	2,05	0,21
5.7	0,85	0,05
5.8	1,52	0,45

***

Citas:

Ascierto, P. A., E. Simeone, M. Sznol, Y. X. Fu, e I. Melero (2010), Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. Semin Oncol 37:508-516.

Aggarwal B.B. (2003), Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat. Rev. Immunol. 3(9),745-56.

Banner D. et al (1993), Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. Cell 73, 431-445.

Bodmer J., Schneider P. y Tschopp, J. (2002), The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in Biochemical Sciences 27(1), 19-26.

Broll, K., Richter, G., Pauly, S., Hofstaedter, F., y Schwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. Am J Clin Pathol 115, 543-549.

Buechele, C., Baessler, T., Schmiedel, B.J., Schumacher, C.E., Grosse-Hovest, L., Rittig, K., y Salih, H.R. (2012). 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Immunol 42, 737-748.

Choi, B.K., Kim, Y.H., Kwon, P.M., Lee, S.C., Kang, S.W., Kim, M.S., Lee, M.J., y Kwon, B.S. (2009). 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells. J Immunol 182, 4107-4115.

Cuadros, C., Dominguez, A.L., Lollini, P.L., Croft, M., Mittler, R.S., Borgstrom, P., y Lustgarten, J. (2005). Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in

combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice. Int J Cancer 116, 934-943.

Curran, M.A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A., y Allison, J.P. (2011). Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. PLoS One 6, e19499.

Diehl, L., van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J., Mittler, R., Toes, R.E., y Offringa, R. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. J Immunol 168, 3755-3762.

Dubrot, J., Milheiro, F., Alfaro, C., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Perez-Gracia, J.L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevejo, J.L., Ochoa, M.C., Hervas-Stubbs, S., et al. (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. Cancer Immunol Immunother 59, 1223-1233.

Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., y Okumura, K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. Int Immunol 14, 275-286.

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., y Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. J Transl Med 11, 215.

Heinisch, I.V., Daigle, I., Knopfli, B., y Simon, H.U. (2000). CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. Eur J Immunol 30, 3441-3446.

Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (2012), Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. J. Immunother. 35, 418-429.

Ju, S.A., Cheon, S.H., Park, S.M., Tam, N.Q., Kim, Y.M., An, W.G., y Kim, B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. Int J Cancer 122, 2784-2790.

Kienzle, G., y von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary

human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. Int Immunol 12, 73-82.

Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S., y Kang, C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. J Immunol 180, 2062-2068.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S., y Kwon, B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. Mol Cancer Ther 8, 469-478.

Kwon, B.S., y Weissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 1963-1967.

Lee, H., Park, H.J., Sohn, H.J., Kim, J.M., y Kim, S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. J Surg Res 169, e43-50.

Levitsky, V., de Campos-Lima, P.O., Frisan, T., y Masucci, M.G. (1998). The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. J Immunol 161, 594-601.

Li, F., y Ravetch, J.V. (2011). Inhibitory Fcgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science 333, 1030-1034.

Lin, W., Voskens, C.J., Zhang, X., Schindler, D.G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K., et al. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. Blood 112, 699-707.

Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., y Chen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. Cell Immunol 190, 167-172.

Melero, I., Shuford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellstrom, K.E., Mittler, R.S., y Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. Nat Med 3, 682-685.

Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., y Carter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. Nat Biotechnol 16, 677-

681.

Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., Rodriguez, I., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervas-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A., et al. (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. Clin Cancer Res 19, 6151-6162.

Mueller, D., Frey, K., Kontermann, R.E. (2008), A novel antibody-4-1BBl fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, J. Immunother. 31, 714-722.

Murillo, O., Dubrot, J., Palazon, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Solano, S., Ochoa, M.C., Berasain, C., Gabari, I., et al. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. Eur J Immunol 39, 2424-2436.

Narazaki, H., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., y Chen, L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. Blood 115, 1941-1948.

Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., et al. (2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. Blood 106, 4241-4248.

Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. Circulation 117, 1292-1301.

Palazon, A., Teijeira, A., Martinez-Forero, I., Hervas-Stubbs, S., Roncal, C., Penuelas, I., Dubrot, J., Morales-Kastresana, A., Perez-Gracia, J.L., Ochoa, M.C., et al. (2011). Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. Cancer Res 71, 801-811.

Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J., y Lotz, M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. Blood 85, 1043-1052.

Shao, Z., y Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. J Leukoc Biol 89, 21-29.

Shi, W., y Siemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. Anticancer Res 26, 3445-3453.

Simeone, E., y Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. J Immunotoxicol 9, 241-247.

Snell, L.M., Lin, G.H., McPherson, A.J., Moraes, T.J., y Watts, T.H. (2011). T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. Immunol Rev 244, 197-217.

Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., Ngiow, S.F., Duret, H., Yagita, H., Teng, M.W., y Smyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7142-7147.

Teng, M.W., Sharkey, J., McLaughlin, N.M., Exley, M.A., y Smyth, M.J. (2009). CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. J Immunol 183, 1911-1920.

von Kempis, J., Schwarz, H., y Lotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. Osteoarthritis Cartilage 5, 394-406.

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., y Guo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. PLoS One 8, e84927.

Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., y Chen, L. (2002). Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. J Immunol 168, 4262-4267.

Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M., y Chen, L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. Blood 103, 177-184.

Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y, Khawli, L.A., Hu, P., Epstein, A.L. (2007). Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. Clin. Cancer Res. 13, 2758-2767.

Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., et al. (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. J Immunol 184, 787-795.

***

5